

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Märt Rannap

**Inimese ja koduhiire replikatiivse CMG helikaasi subühikud Mcm4 ja Gins2 kui
võimalikud rakutsükli kontrollkinaas Chk1 substraadid**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Nele Tamberg

PhD Ivar Ilves

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 DNA replikatsiooni initsiatsioon eukarüootides.....	6
1.1.1 Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine	6
1.1.2 Prereplikatiivsete komplekside aktiveerimine.....	8
1.1.3 Korduva replikatsiooni tõkestamine.....	9
1.2 Replikatiivne CMG helikaas ja selle komponendid	10
1.2.1 Heksameerne Mcm2-7 helikaas.....	10
1.2.1.1 Mcm2-7 helikaasi subühikute ehitus	10
1.2.1.2 Mcm2-7 heksameer	13
1.2.2 Heterotetrameerne GINS kompleks ja valk Cdc45	14
1.2.3 Replikatiivne CMG helikaas	16
1.3 Replikatsiooni regulatsioon genotoksilise stressi tingimustes	17
1.3.1 S-faasi kontrollpunkti aktiveerimine	18
1.3.2 Replikatsiooni regulatsioon S-faasi kontrollpunkti vastuskinaaside kaudu	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1 Töö eesmärgid	21
2.2 Materjalid ja meetoodika.....	21
2.2.1 Rakuliinid ja söötmed.....	21
2.2.2 Kloneerimine	22
2.2.3 Rekombinantse bakmiidse DNA valmistamine.....	25
2.2.4 Sf9 rakkude transfektsioon ja rekombinantsete bakuloviiruste kogumine	26
2.2.5 Valkude ekspresseerimine	27
2.2.6 FLAG-afiinsuskromatograafia	28
2.2.7 Geelfiltratsioon	29
2.2.8 Mcm2-7 (4ΔN) komplekside kontsentreerimine	30
2.2.9 Mcm4 N-terminuste fosfataasitöötlus	30
2.2.10 <i>In vitro</i> kinaasikatsed.....	30
2.2.11 Polüakrüülamiidgeelide ja PVDF membraanide värvimiseks kasutatud tehnikad.....	31
2.2.11.1 <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	31
2.2.11.2 Valkude värvimine hõbeda meetodil.....	31

2.2.11.3 Colloidal Gold Total Protein Stain	32
2.2.12 Western blot	32
2.3 Tulemused ja arutelu	33
2.3.1 Bac-to-Bac [®] bakuloviiruse ekspressioonisüsteem.....	34
2.3.2 Rekombinantsete bakuloviiruste valmistamine	36
2.3.2.1 Rekombinantseid valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste kloneerimine pFastBac1 [™] vektorisse	36
2.3.2.2 Rekombinantseid valke kodeerivaid nukleotiidseid järjestusi sisaldavate bakmiidsete DNA-de valmistamine	36
2.3.2.3 Sf9 rakkude transfektsioon, bakuloviiruse paljundamine ja rekombinantsete valkude ekspressiooni kontrollimine	37
2.3.3 Mcm2-7 (4ΔN) komplekside puhastamine.....	39
2.3.4 Mcm4 N-terminuste puhastamine	41
2.3.5 <i>In vitro</i> kinaasikatsed.....	43
KOKKUVÕTE	46
SUMMARY	47
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	49
LISAD	55
Lisa 1. Erinevate hulkraksete Mcm4 N-terminaalsete ja Psf2 C-terminaalsete piirkondade joondamine	55
TÄNUAVALDUSED.....	56

KASUTATUD LÜHENDID

AAA+ – *ATPases associated with various cellular activities*

APC/C – *anaphase promoting complex/cyclosome*

ARS – *autonomously replicating sequence* (autonoomselt replitseeruv järjestus)

ATM – *Ataxia Telangiectasia mutated*

ATR – *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*

ATRIP – *ATR interacting protein*

BSA – *bovine serum albumin* (veise seerumi albumiin)

Cdc6/45 – *cell division cycle 6/45*

Cdt1 – *cell division cycle 10-dependent transcript 1*

Chk1/2 – *checkpoint kinase 1/2*

CMG – Cdc45-Mcm2-7-GINS kompleks (replikatiivne helikaas)

Dbf4 – *dumbbell forming 4*

DDK – *Dbf4-dependent kinase* (Dbf4-sõltuv kinaas)

Dpb11 - *DNA polymerase B (II)*

GINS – *go, ichi, ni, san* (jpn viis, üks, kaks, kolm) kompleks

HRP – *horseradish peroxidase* (mädarõika peroksidaas)

Mcm – *minichromosome maintenance*

MRN – Mre11-Rad50-Nbs1 (kaheaheelaliste katkete sensorkompleks)

ORC – *origin recognition complex* (*origin*'i äratundev kompleks)

Plk1 – *polo-like kinase 1*

Pre-RC – *pre-replicative complex* (prereplikatiivne kompleks)

Psf1/2/3 – *partner of Sld5 1/2/3*

RPA – *replication protein A* (replikatsioonivalk A)

Sld2/3/5 – *synthetically lethal with Dpb11-1 2/3/5*

TopBP1 – *topoisomerase II-binding protein*

SISSEJUHATUS

Rakkude paljunemine ja elujõuliste tütarakkude teke eeldab vanemraku genoomi täpset ja kontrollitud replitseerimist. DNA kahekordistamise eest vastutab spetsiifiline masinavärk – replisoom, mille keskseks komponendiks on eukarüootides DNA kaksikheeliksi lahutamise ja replisoomi liikumapanemise eest vastutav replikatiivne CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS) helikaas. Helikaasikompleks komplekteeritakse replikatsiooni initsiatsioonietapi käigus, mis on eukarüootides kaheastmeline protsess. Initsiatsiooni esimeses etapis laetakse kromatiinile CMG katalüütiliseks tuumikuks olev heksameerne Mcm2-7 kompleks. Teises etapis seonduvad seejärel Mcm2-7 heksameerile kaks lisafaktorit – tetrameerne GINS kompleks ja valk Cdc45, mis aktiveerivad heksameeri ning viivad aktiivse CMG helikaasi tekkele.

Keskse positsiooni tõttu replisoomi funktsioneerimises mängib CMG helikaas lisaks normaalingimustes toimuvale replikatsioonile olulist rolli ka genotoksilise ehk DNA kahjustusi tekitada võiva stressi tingimustes toimival replikatsioonil. Genotoksilisse stressi sattunud rakus on oluline aeglustada üldist replikatsiooni kulgu, et võita aega tekkinud kahjustuste likvideerimiseks. Aeglustamist vahendab S-faasi kontrollpunkt, mille aktiveerumisel takistatakse mitmete CMG aktivatsioonifaktorite fosforüleerimise kaudu helikaasi moodustumist. Teadmised selle kohta, kuidas toimub juba aktiveeritud replisoomide inhibeerimine, on aga praegu veel sügavalt puudulikud. Kuna on leitud, et vead S-faasi kontrollpunkti vastuskinaaside poolt vahendatavates radades on seotud arvukate haiguslike seisunditega, on taoliste mehhanismide täpne väljaselgitamine eriliselt olulise tähtsusega.

Käesoleva bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade eukarüootse DNA replikatsiooni initsiatsioonist ja selle regulatsioonist, kirjeldatakse lähemalt replikatiivse CMG helikaasi struktuuri ning analüüsitakse replikatsiooni läbiviimist genotoksilisse stressi sattunud rakus. Töö eksperimentaalses osas konstrueeritakse inimese ja koduhiire Mcm2-7 ja GINS komplekside subühikutel Mcm4 ja Gins2 põhinevad ekspressioonivektorid, mille abil ekspresseeritavad rekombinantsed valgud hõlbustaksid antud subühikutes S-faasi kontrollpunkti aktiveeritavate kinaaside märklaudaminohappejääkide kaardistamist. Lisaks puhastatakse valmistatud ekspressioonivektoreid kasutades Mcm4 subühikul põhinevad rekombinantsed valgud ning analüüsitakse nende fosforüleerimist rakutsükli kontrollkinaas Chk1 poolt. Käesolev bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Märksõnad: replikatsioon, CMG helikaas, Mcm2-7, genotoksiline stress, *checkpoint*-kinaas

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

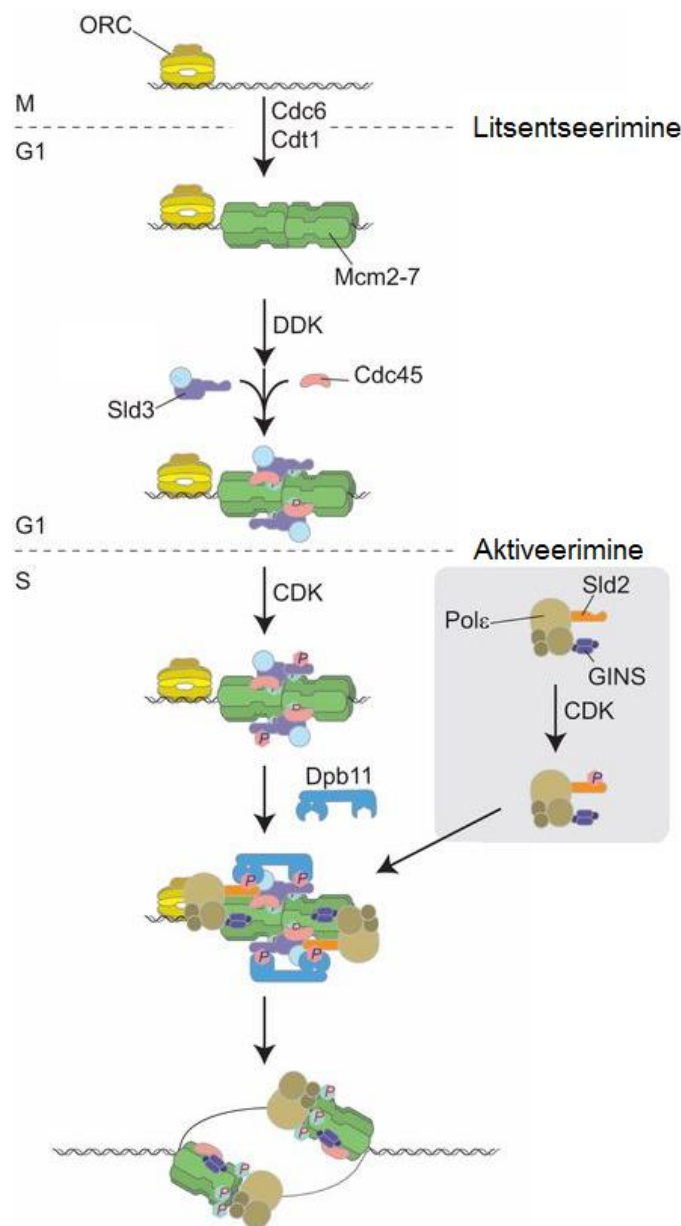
1.1 DNA replikatsiooni initsiatsioon eukarüootides

DNA replikatsiooni initsiatsiooni on eukarüootides kõige paremini uuritud üherakulise mudelorganismi, pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) põhjal, mistõttu lähtutakse ka käesolevas töös initsiatsioonietappide kirjeldamisel ennekõike pagaripärmi põhjal loodud mudelist. Pagaripärmis initsieeritakse replikatsioon spetsiifilistelt nukleotiidseid konsensusjärjestusi sisaldavatelt replikatsiooni alguspunktidelt ehk *origin*'idelt, mida nimetatakse ARS (ingl *autonomously replicating sequence*) elementideks (Dhar *et al.*, 2012). Need on reeglina mõnesaja aluspaari pikkused järjestused, mis sisaldavad replikatsioonivalke siduvaid spetsiifilisi domeene (Dhar *et al.*, 2012). Ehkki kõrgemate taksonite replikatsiooni *origin*'id teadaolevalt DNA järjestuse tasemel konserveerunud elemente ei sisalda ja *origin*'ide asukoha määramine toimub neis arvatavasti mitmete erinevate tegurite koosmõjul (Yekezare *et al.*, 2013), on replikatsiooni initsieerimise mehhanism nii pagaripärmis kui kõrgemates eukarüootides väga sarnane, hõlmates kaht spetsiifilist ning omavahel ajaliselt eraldatud etappi – *origin*'ide litsentseerimist ja *origin*'ide aktiveerimist. *Origin*'ide litsentseerimise käigus laetakse DNA kaksikahelale kaks omavahel koordineeritud replikatiivse helikaasikompleksi tuumikut, Mcm2-7 (*minichromosome maintenance* valgud 2-7) heksameeri (Evrin *et al.*, 2009; Gambus *et al.*, 2011). Need on esialgu aga inaktiivsed ning aktiveeritakse alles teise etapi, *origin*'ide aktiveerimise käigus.

1.1.1 Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine

Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine toimub kas hilises M- või varases G1-faasis, mil replikatsiooni alguspunktile seondub ATP-st sõltuvalt kuuesubühikuline *origin*'i äratundev kompleks (ORC, ingl *origin recognition complex*, joonis 1) (Bell ja Dutta, 2002; Klemm *et al.*, 1997). Kui ATP-ORC kompleks on DNA-ga seondunud, interakteerub sellega esmalt ATP-Cdc6 (ingl *cell division cycle* 6) ning seejärel Cdt1 (ingl *cell division cycle* 10-*dependent transcript* 1), mis on seotud heksameerse Mcm2-7 helikaasiga (Masai *et al.*, 2010). Järgnevalt hüdrolüüsitakse helikaasiga seotud ATP, mille tulemusel vabaneb Cdt1 ning heksameer „laetakse“ DNA kaksikheeliksile (Coster *et al.*, 2014). Ehkki *origin*'ide litsentseerimise lõpuks eksisteerib kromatiinil alati kaks omavahel ühendatud nn *head-to-head* konformatsioonis Mcm2-7 heksameeri ehk prereplikatiivne kompleks (pre-RC, ingl *pre-replicative complex*, joonis 1, 3B) (Evrin *et al.*, 2009; Gambus *et al.*, 2011), on teise Mcm2-7

kompleksi täpne laadimismehhanism hetkel teadmata. *Origin*'ide litsentseerimise lõpetab ORC-i ja Cdc6-ga setoud ATP hüdrolüüs (Coster *et al.*, 2014). Kuigi antud hüdrolüüsietappide funktsioon on praegu veel ebaselge, on ORC-iga seotud ATP hüdrolüüsi ühe võimaliku funktsioonina pakutud, et see võimaldab ORC-il prereplikatiivsest kompleksist dissotsieeruda (Bowers *et al.*, 2004). Kuna aktiveerimata topeltheksameerid võivad mööda DNA-d passiivselt liikuda (Remus *et al.*, 2009), saab ORC seeläbi litsentseerida üht *origin*'i korduvalt (Bowers *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2002). See on oluline mehhanism helikaaside ülehulgas kromatiinile viimiseks, mis leiab rakendust genotoksilise stressi puhul, mil on vaja lõpetada seiskunud replisoomide poolt poolelijäänud DNA süntees (vt täpsemalt peatükist 1.3.2).



Joonis 1. Replikatsiooni alguspunkti litsentseerimine ja prereplikatiivse kompleksi aktiveerimine. Eukarüootide replikatsiooni initsiatsioon jaguneb kaheks spetsiifiliseks etapiks. Esimene etapp, replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine, algab *origin*'i äratundva kompleksi (ORC-i) seondumisega *origin*'ile. Protsessis

on seejärel vajalikud valgud Cdc6 ja Cdt1, mis koostöös ORC-iga „laevad“ kromatiinile kaks Mcm2-7 helikaasi. Protsessi tulemusel moodustub prereplikatiivne kompleks. Teise etapi, prereplikatiivsete komplekside aktiveerimise käigus komplekteeritakse arvukate aktivatsioonifaktorite abil replikatiivne CMG helikaasikompleks, mis on võimeline lahutama DNA kaksikheeliksit. Vt täiendavaid selgitusi tekstist. Joonis mugandatud Yekezare *et al.* (2013) põhjal.

1.1.2 Prereplikatiivsete komplekside aktiveerimine

Prereplikatiivsete komplekside aktiveerimine (ehk *origin*'ide aktiveerimine) algab G1/S kontrollpunkti läbimisel ning kestab kogu S-faasi vältel (Kaykov ja Nurse, 2015). Aktiveerimise eesmärk on komplekteerida aktiivne replikatiivne helikaasikompleks, mis oleks võimeline lahutama DNA kaksikheeliksit ning võimaldaks seeläbi DNA replitseerimist. Aktiveerimise keskmes on kaks Mcm2-7 helikaasi kofaktorit – valk Cdc45 ja heterotetrameerne GINS (jpn *go, ichi, ni, san*; viis, üks, kaks, kolm) kompleks –, mille seondumisel heksameerile tekib aktiivne replikatiivne helikaas (Ilves *et al.*, 2010). *Origin*'ide aktiveerimine algab laadimisfaktor Sld3 (*synthetically lethal with Dpb11-1 3*) interakteerumisega Cdc45-ga, misjärel mõlemad valgud seonduvad replikatsiooni *origin*'ile, kus Sld3 võimaldab Cdc45-l interakteeruda Mcm2-7 heksameeriga (Joonis 1) (Kamimura *et al.*, 2001). Seejärel interakteerub pre-RC-ga arvatavasti eelnevalt moodustunud kompleks Sld2-DNA polümeraas ϵ -GINS-Dpb11 (ingl DNA *polymerase B (II)*) (Muramatsu *et al.*, 2010). Sld2 ja Sld3 seotakse järgnevalt Dpb 11 kaudu, mis võib olla eelduseks GINS kompleksi ja Cdc45 omavahelisele interakteerumisele ning viib kokkuvõttes replikatiivse Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) helikaasikompleksi tekkeni (Joonis 1, 5C) (Tanaka *et al.*, 2007). Kui pre-RC mõlemad Mcm2-7 heksameerid on lisafaktoritega seondunud, järgneb sellele CMG komplekside üksteisest eraldumine ning DNA lokaalne sulamine, misjärel hakkavad helikaasikompleksid DNA kaksikheeliksit lahutades teineteisest eemalduma (Joonis 1). Seejuures jäävad CMG helikaasid terviklikuks kogu replikatsiooni elongatsiooni ajaks (Gambus *et al.*, 2006). Kuidas helikaaside esialgne eraldumine ja DNA ahelate lahutamine täpselt toimub, on praegu veel teadmata.

Lisaks kirjeldatud valgulistele aktivatsioonifaktoritele sõltub pre-RC-de aktiveerimine ka kahest kinaasist – Dbf4-sõltuvast kinaasist (DDK, ingl *Dbf4-dependent kinase*) ning tsükliin-sõltuvast kinaasist (CDK, ingl *cyclin-dependent kinase*). DDK fosforüleerib mitmete Mcm valkude N-terminaalseid regioone (Francis *et al.*, 2009), võimaldades sellega erinevatel aktivatsioonifaktoritel, sealhulgas Cdc45-l korrektselt Mcm2-7 heksameeriga interakteeruda (Sheu ja Stillman, 2006; Yeeles *et al.*, 2015). CDK fosforüleerib aga Sld2 ja Sld3, luues

sellega mõlemas valgus Dpb11-le sobivad kinnitumiskohad (Joonis 1) (Tak *et al.*, 2006; Zegerman ja Diffley, 2007). Genotoksilisse stressi sattunud rakus reguleerivad *origin*'ide aktiveerimist lisaks nimetatud kinaasidele ka S-faasi kontrollpunkti vastusena aktiveeruv ATR-Chk1 rada. Replikatsiooni regulatsiooni kohta genotoksilise stressi tingimustes võib lugeda lähemalt peatükist 1.3.2.

Nagu käesoleva peatüki alguses vihjati, ei aktiveerita kõiki prereplikatiivseid komplekse üheaegselt, vaid aktiveerimine toimub kogu S-faasi jooksul. Pre-RC-d jagatakse aktiveerimise ajastuse järgi üldistatult kaheks – kohe S-faasi algul aktiveeruvateks ning hiljem, S-faasi käigus aktiveeruvateks (vastavalt varased ja hilised *origin*'id). Pre-RC-de aktiveerimise järjekord pole rakkudes kunagi suvaline, vaid järgib spetsiifilisi, tihti konserveerunud mustreid (Rhind ja Gilbert, 2013). Ehkki aktiveerimise ajalist määratlemist seletav üldistatud teooria täna puudub, on leitud mitmeid aktiveerimise ajastust mõjutavaid faktoreid. Esiteks replitseerub heterokromatiin reeglina eukromatiinist hiljem ning sarnaselt on seostatud atsetüleeritud/aktiivselt transkribeeritavat kromatiini varajaste *origin*'idega (Yekezare *et al.*, 2013). Seejuures ei ole siiski leitud ülegenoomset korrelatsiooni atsetüleerimise ja replikatsiooni aktivatsiooni ajastuse vahel (Yekezare *et al.*, 2013). Samuti leidub mitmeid juhte, kus heterokromatiin replitseerub vara ning eukromatiin pigem hilja (Yekezare *et al.*, 2013). Teiseks on teada, et aktivatsioonifaktoreid on rakus tunduvalt vähem kui kromatiinile laetud Mcm2-7 helikaase ning on näidatud, et nende üleekspressseerimine võib muuta hiliste *origin*'ide aktiveerimist varasemaks (Mantiero *et al.*, 2011). Seega määrab aktivatsioonifaktorite seondumine, milliseid *origin*'e parasjagu aktiveeritakse. Samas on teadmata, miks on erinevatel pre-RC-del aktivatsioonifaktorite suhtes erinev afiinsus. Antud fenomeni võivad aidata seletada hiljuti pagaripärmis leitud spetsiifilised *forkhead* transkriptsioonifaktorid, mis on võimelised tooma kokku varased *origin*'id (Knott *et al.*, 2012). Nimetatud transkriptsioonifaktorid aitavad seejärel pre-RC-del seonduda limiteeriva aktivatsioonifaktori ja CMG helikaasikompleksi integraalse komponendi, Cdc45 valguga juba G1 faasis (Knott *et al.*, 2012).

1.1.3 Korduva replikatsiooni tõkestamine

Selleks, et välistada DNA korduv replitseerimine ühe rakutsükli jooksul, on replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine ja prereplikatiivsete komplekside aktiveerimine rakutsüklis ajaliselt eraldatud. *Origin*'ide litsentseerimine saab toimuda vaid hilises M- ning varases G1-faasis, kuna väljaspool seda perioodi blokeerib litsentseerimise CDK-de aktiivsus ning

kõrgemates eukarüootides ka spetsiifiline inhibiitorvalk geminiin (Lygerou ja Nurse, 2000). CDK-d fosforüleerivad otseselt prereplikatiivsete komplekside moodustumiseks vajalikke valgulisi faktoreid, teiste hulgas Cdc6-t, märgistades selle ubikvitiin-sõltuvaks degradatsiooniks (Diffley, 2004). Geminiin on aga litsentseerimiseks olulise valgu Cdt1 stöhhiomeetriline inhibiitor (Wohlschlegel *et al.*, 2000). CDK-de aktiivsus on rakutsüklis kõrge S-, G2- ja M-faasi ajal, kuid langeb hilises M-faasis ning jääb madalaks kogu G1 faasi ajaks (Chibazakura *et al.*, 2004). Seda põhjustab M-faasi kontrollpunkti läbimisel aktiveeruv spetsiifiline E3 ubikvitiini ligaas APC/C (ingl *anaphase-promoting complex/cyclosome*), mis koostöös adaptorvalkudega märgistab CDK-de aktivaatorid, tsükliinid, ubikvitiin-sõltuvaks proteolüüsiks (Li ja Zhang, 2009). APC/C suunab proteolüüsi ühtlasi ka DDK aktivaatori Dbf4 ning geminiini (Diffley, 2004; McGarry ja Kirschner, 1998). Vastav ubikvitiinligaas inaktiveeritakse G1 faasi lõpus adaptorvalgu Cdh1 fosforüleerimise kaudu, mida viivad läbi APC/C suhtes resistentsete tsükliinide poolt aktiveeritavad CDK-d (Zachariae *et al.*, 1998).

Uus CDK-de aktiivsuse kasv ning APC/C inhibeerimine blokeerib eelpoolmainitud põhjustel edasise *origin*'ide litsentseerimise ning võimaldab samaaegselt prereplikatiivsete komplekside aktiveerimist. Selline CDK-de ning APC/C vahelduv aktiivsus ongi rakus replikatsiooni ajastamise peamiseks regulaatormehhanismiks.

1.2 Replikatiivne CMG helikaas ja selle komponendid

1.2.1 Heksameerne Mcm2-7 helikaas

Mcm kompleks on seni kristalliseeritud vaid arhedest ning arhedest pärineb ka suur osa kompleksi puudutavaid biokeemilisi uuringuid, mistõttu lähtutakse järgneva struktuurianalüüsi puhul just arhede Mcm heksameerist. Ehkki erinevalt eukarüootide Mcm2-7 heterohexameerist eksisteerib Mcm kompleks arhedes homoheksameerina, näitavad vastavate järjestuste joondamised oluliste sekundaarstruktuursete elementide puhul siiski kõrget konserveeritust (Bae *et al.*, 2009). Seetõttu on arhede Mcm homoheksameer eukarüootide heterohexameerse kompleksi kirjeldamiseks vähemalt üldises plaanis kindlasti legitiimne mudel (vt lisaks Bae *et al.*, 2009).

1.2.1.1 Mcm2-7 helikaasi subühikute ehitus

Mcm (*minichromosome maintenance*) valke 2-7 kodeerivaid geene kirjeldati esmakordselt

pagaripärmis tehtud geneetilise sõeluuringu käigus, milles otsiti minikromosoomide alalhoidmist mõjutavaid valke (Forsburg, 2004). Katsetes kasutatud pagaripärmi mutantidel oli nimelt probleeme tsentromeerset järjestust ning replikatsiooni alguspunkti sisaldavate plasmiidide säilitamisega, mistõttu pidi neist ühe funktsioneerimine olema defektne. Esmased andmed näitasid, et Mcm2-7 valgud osalevad just replikatsioonil. Ehkki eelpoolmainitud sõeluuringu käigus tuvastati teisigi valke, mis nimetati sarnaselt Mcm-deks (nt Mcm1 ja Mcm10), ei oma need Mcm2-7 valkudega ühist struktuuri ega funktsiooni (Forsburg, 2004).

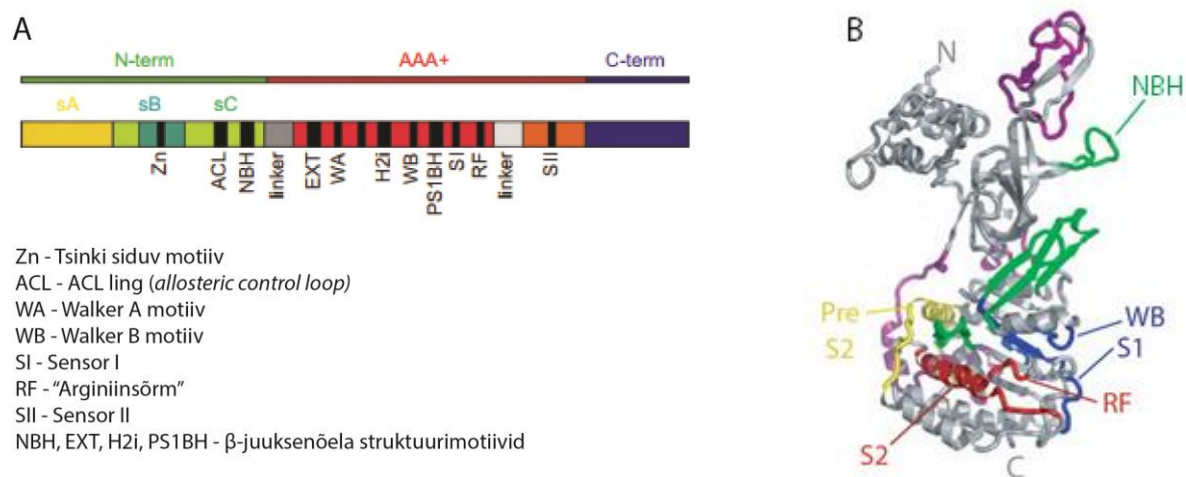
Praeguseks on teada, et Mcm2-7 valgud moodustavad rõngakujulise heksameerse kompleksi (Joonis 5A, B), mis talitleb eukarüootides replikatiivse CMG helikaasi keskse komponendina (Costa *et al.*, 2011). Heksameeri kõik kuus subühikut on homoloogsed ning koosnevad kolmest spetsiifilisest domeenist: N-terminaalne, AAA+ ning C-terminaalne domeen (joonis 2A) (Costa ja Onesti, 2009). Vaieldamatult olulisim neist on ATP hüdroolüüsi eest vastutav kõrgeltkonserveerunud AAA+ domeen, mis on helikaasi katalüütiliseks tuumikuks (Iyer *et al.*, 2004). Tegemist on AAA+ (*ATPases associated with various cellular activities*) superperekonda kuuluva ATP-aasiga, mis sarnaselt teistele antud perekonna liikmetele sisaldab kaht aktiivtsentrit moodustavat piirkonda: esiteks ATP sidumise ja hüdroolüüsi eest vastutavat (nn P-ling) ning teiseks ATP γ -fosfaati stabiliseerivat (nn „kaane“ regioon) (Iyer *et al.*, 2004). P-lingu kuuluvad kolm spetsiifilist motiivi: Walker A motiiv, mis osaleb ATP sidumises, ning motiivid Walker B ja Sensor 1 (Joonis 2A, B), mis aktiveerivad hüdroolüüsiks vajaliku veemolekuli (Bochman ja Schwacha, 2009). „Kaane“ regiooni kuuluvad konserveerunud arginiini jääki sisaldavad Sensor 2 ja spetsiifiline SRFD motiiv (nn „arginiinsõrm“) (Joonis 2A, B) (Bochman ja Schwacha, 2009), mis stabiliseerivad ATP hüdroolüüsil lahkuvaks rühmaks olevat ATP γ -fosfaati (Bae *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2004).

Lisaks ATP-aasset aktiivsust võimaldavatele regioonidele sisaldab AAA+ domeen ka kolme spetsiifilist DNA-ga interakteeruvat β -juuksenõela struktuuri: EXT, H2i ja PS1 (ingl vastavalt *exterior, helix 2 insert* ja *pre-sensor 1 β -hairpin*) (joonis 2A, B) (Brewster ja Chen, 2010). Juuksenõel H2i ulatub otse heeliksi kanalisse, kus selle tipus paiknev väike α -heeliks võib toimida DNA kaksikahelat lahutava steerilise takistusena (Brewster *et al.*, 2008). Seda hüpoteesi toetab asjaolu, et antud juuksenõela deleteerimisel on helikaas võimetu kaksikahelalist DNA-d denatureerima (Jenkinson ja Chong, 2006). Juuksenõel PS1 asub samuti heksameeri sisemuses, paiknedes helikaasi külghanali lähedal (Brewster ja Chen, 2010). PS1 on võimeline siduma DNA-d (Brewster ja Chen, 2010) ning osaleb samuti DNA kaksikheeliksi lahutamises, ehkki selle täpne mehhanism on teadmata (Lam *et al.*, 2013).

EXT juuksenõel, mis asetseb helikaasi külgkanali väljapääsu ääres, on sarnaselt võimeline DNA-d siduma, kuid selle roll helikaasi töös on ebaselge (Brewster ja Chen, 2010).

Vähemkonserveerunud N-terminaalne domeen jaguneb omakorda A, B ja C aladomeenideks (Joonis 2A) (Costa ja Onesti, 2009). C aladomeen vastutab heksameeri formeerumise eest ning sisaldab kaht spetsiifilist struktuuri – ACL (ingl *allosteric control loop*) lingu ning N-terminaalset β -juuksenõela (NBH) (Joonis 2A) (Costa ja Onesti, 2009). ACL ling interakteerub naabersubühiku AAA+ regiooniga ning võib olla sellega subühikute vahel ATP-hüdrolüüsil tekkinud mehaanilise liikumise vahendajaks (Brewster ja Chen, 2010). Positiivselt laetud NBH juuksenõel ulatub aga helikaasi sisemisse kanalisse (Joonis 2B) ning seondub seal helikaasist väljuva ssDNA-ga (Brewster ja Chen, 2010). On näidatud, et mutatsioonid NBH-s vähendavad helikaasi aktiivsust võrdeliselt väheneva DNA sidumisvõimega ning helikaas, milles on mutantsed nii NBH kui PS1 juuksenõelad, on täielikult võimetu DNA-d siduma (McGeoch *et al.*, 2005). Lisaks kasvab NBH seondumisel DNA-ga oluliselt helikaasi protsessiivsus (Barry *et al.*, 2007), kusjuures samas uuringus leiti, et terviklik N-terminaalne domeen on oluline faktor helikaasile DNA substraadil liikudes omase 3'-5' polaarsuse määramisel.

N-terminuse B aladomeen sisaldab tsinki siduvat motiivi (Joonis 2A, B), mille olulisust komplekssete komplekside formeerumisel on näidanud mitmed varasemad uuringud (vt Poplawski *et al.*, 2001; You *et al.*, 2002). Seetõttu on võimalik, et heksameeri komplekteerimisel mängib olulist rolli ka B aladomeen (Bae *et al.*, 2009). Suuremalt jaolt α -heeliksitest koosnev vähekonserveerunud A aladomeen paikneb helikaasi perifeerias ning selle funktsioon on suuresti teadmata (Joonis 2A, B) (Costa ja Onesti, 2009). Uuringud on näidanud, et domeen ei mängi tavalises helikaasi töös rolli, kuid võib olla seondumispaiaks erinevatele reguleerijatele valkudele (Kasiviswanathan *et al.*, 2004). Näiteks on leitud, et GINS kompleks interakteerub Mcm2-7 heksameeri subühikute Mcm3 ja Mcm5-ga just A-domeeni kaudu (Costa *et al.*, 2011). Samuti on teadmata lühikese C-terminaalse domeeni täpne struktuur ning funktsioon (Joonis 2A). On näidatud, et antud piirkonna deleteerimine toob võrreldes deletsioonita helikaasiga kaasa suurenenud ATP hüdrolüüsi ja protsessiivsuse, mistõttu võib C-terminaalsel domeenil olla roll ATP hüdrolüüsi efektiivsuse reguleerimisel (Barry *et al.*, 2007; Jenkinson ja Chong, 2006).

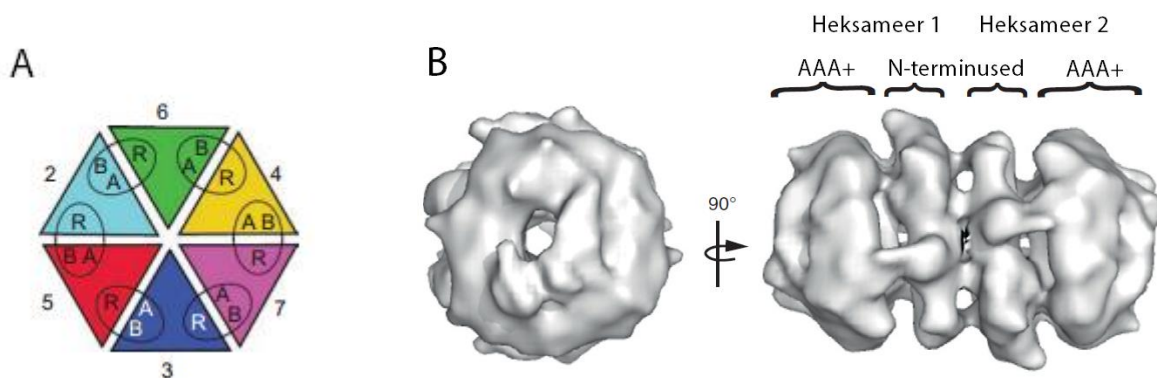


Joonis 2. Mcm homoheksameeri subühiku ehitus. (A) Mcm homoheksameeri subühiku primaarstruktuur. Kollase, tsüaansinise ja rohelise värviga on tähistatud vastavalt N-terminaalse domeeni alla kuuluvad subdomeenid A (sA), B (sB) ja C (sC). Punase ja oranži värviga on tähistatud AAA+ domeeni alla kuuluvad regioonid. Tumesinisega on näidatud lühike C-terminaalne piirkond. *Linker*-piirkonnad tähistavad domeene üksteisest eraldavaid motiive. Lühendid NBH, EXT, H2i ja PS1BH (ehk PS1) tähistavad vastavalt N-terminaalset, *exterior*, *helix 2 insert* ja *pre-sensor 1* β -juuksenõela struktuurimotiivi. Joonis mugandatud Costa ja Onesti (2009) põhjal. (B) Arhe *Sulfolobus solfataricus* Mcm homoheksameeri subühiku ruumiline struktuur. Subühik on näidatud külgsuunas nii, et vasakul pool asub heksameeri perifeeria ning paremal tsentraalne kanal. Lillaga on tähistatud N-terminuse B subdomeeni tsinki siduv motiiv, rohelisega juuksenõelamotiivid, sinisega aktiivtsentri P-lingu motiivid ning punasega aktiivtsentri „kaane“ regiooni motiivid. Kollasega on näidatud piirkond (Pre S2), mis võimaldab Mcm valkudes erinevalt teistest AAA+ ATP-aasidest Sensor 2 motiivil ulatuda teise subühiku aktiivtsentrisse. N ja C tähistavad vastavalt valgus N- ja C-terminusi (Bochman ja Schwacha 2009).

1.2.1.2 Mcm2-7 heksameer

Mcm2-7 valgud oligomeriseeruvad ATP-st sõltuvalt spontaanselt rõngasjaks heksameeriks (Joonis 5A, B), mille keskele jääb DNA kaksikheeliksile mahutav positiivselt laetud kanal (Joonis 3B) (Costa ja Onesti, 2009). Subühikute N-terminaalsed, AAA+ ja C-terminaalsed domeenid paigutuvad heksameeris kohakuti, mis võimaldab neil koöperatiivselt helikaasi tööle panustada (Brewster ja Chen, 2010). Eukariootide heteroheksameeri puhul on helikaasi kõik subühikud asendamatud (Forsburg, 2004), mille üks olulisemaid põhjuseid on kahtlemata aktiivtsentrite kompleksne ehitus, kus aktiivse reaktsioonitsentri tekkimiseks peavad täpselt kokku saama ühe subühiku P-lingu ja teise subühiku „kaane“ domeenid (Joonis 3A) (Costa ja Onesti, 2009). Tüüpiliselt AAA+ ATP-aasidele ei hüdrolyüsi Mcm2-7 helikaasis nimelt ATP-d mitte iga subühik iseseisvalt, vaid aktiivtsenter moodustub kahe subühiku vahele (Erzberger ja Berger, 2006). Selline struktuur on spetsiifiliselt mõeldud subühikutevahelise mehaanilise liikumise tekitamiseks ning seeläbi helikaasi töö

võimaldamiseks (Erzberger ja Berger, 2006). Korrektses aktiivtsentris satuvad esmalt lähestikku ühe subühiku P-lingu Walker A ja B motiivid, mis koordineerivad omavahel ATP-d siduvat Mg^{2+} -iooni, ning Walker B motiiv ja Sensor 1, mis aktiveerivad atakiks vajaliku veemolekuli (Bochman ja Schwacha, 2009). Seejärel toob teise subühiku „kaane“ domeen aktiivtsentrisse arginiini sisaldavad Sensor 2 ja „arginiinsõrme“, mis stabiliseerivad seotud ATP lahkuvaks rühmaks olevat γ -fosfaati (Bae *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2004).



Joonis 3. Mcm homoheksameeri ehitus. (A) Nii homo- kui heteroheksameersele Mcm helikaasile omane aktiivtsentri ehitus. Aktiivtsenter moodustub ühe subühiku Walker A (A), Walker B (B) ja Sensor 1 (näitamata) motiividest ning teise subühiku „Arginiinsõrme“ (R) ja Sensor 2 (näitamata) motiividest. Subühikud on nummerdatud Mcm2-7 heksameeris paiknemise järjekorras (Costa ja Onesti, 2009). (B) Kahest Mcm homoheksameerist koosneva prereplikatiivse kompleksi ehitus. Inaktiivsed Mcm helikaasid paiknevad kromatiinil vastastikku nn *head-to-head* konformatsioonis ning on seotud omavahel N-terminaalsete domeenide kaudu. Joonisel on esitatud kompleksi otsavaade ning külgsuurt. DNA läbib nii tervikkompleksi kui individuaalseid helikaase otsavaates näha oleva tsentraalse kanali kaudu (Boos *et al.*, 2012).

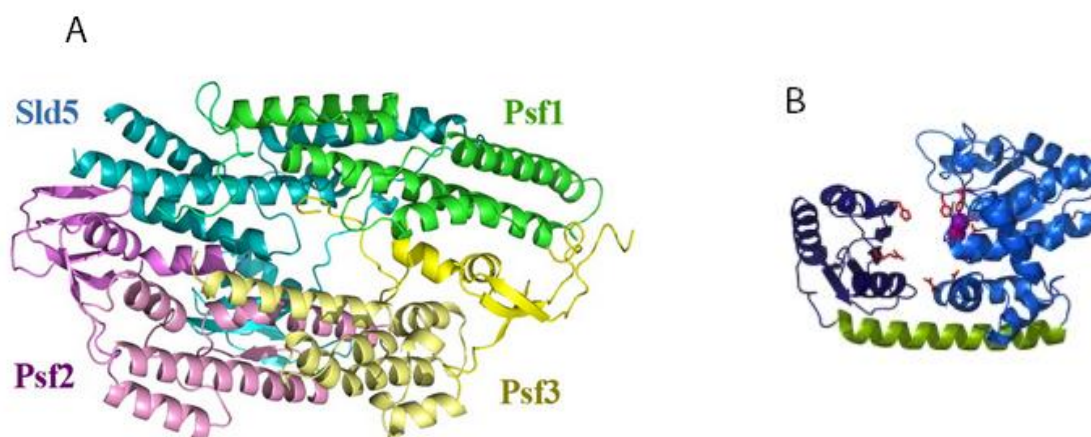
1.2.2 Heterotetrameerne GINS kompleks ja valk Cdc45

Eukarüootne GINS on heterotetrameerne kompleks, mis koosneb väikestest, ligikaudu 200 aminohappejärgi pikkustest subühikutest Sld5 (ingl *synthetically lethal with Dpb11-1* 5), Psf1 (ingl *partner of Sld5* 1), Psf2 ja Psf3 (joonis 4A) (alternatiivselt on kõrgemates eukarüootides vastavalt kasutusel ka tähistus Gins4/1/2/3) (Chang *et al.*, 2007). Kompleksi kõik subühikud on paraloogid, kuid paarid Psf1-Sld5 ja Psf2-Psf3 on omavahel mõnevõrra sarnasemad (Makarova *et al.*, 2005). Nimelt moodustavad kõikide subühikute üldise ehitusplaani kaks spetsiifilist piirkonda, kuid need on eelpoolmainitud paaride vahel permuteerunud (Choi *et al.*, 2007). Esimene piirkond moodustub peamiselt α -heeliksitest ning paikneb Psf2 ja Psf3 puhul nende C-terminuses ja Sld5 ja Psf1 puhul vastavalt N-terminuses (Choi *et al.*, 2007). Teine regioon sisaldab α - ja β -struktuurielementide segu, millest moodustub β -tünjas struktuur. See paikneb omakorda Psf2 ja Psf3 N-terminuses ning Sld5 C-terminuses (Choi *et al.*, 2007). Psf1 on mõnevõrra erandlik, koosnedes vaid α -heeliksitest ning struktureerimata

C-terminaalsest piirkonnast (Chang *et al.*, 2007).

Kirjeldatud struktuurielemendid on olulised nii GINS kompleksi komplekteerumisel kui hilisemal subühikute seondumisel Mcm2-7 heksameeri ja Cdc45-ga. GINS kompleksi moodustumisel seonduvad esmalt omavahel Psf1-Sld5 ja Psf2-Psf3. See toimub α -heeliksate kaudu, mille suur interaktsioonipind seob subühikud hüdfoobsete jõududega tugevalt kokku. Seejärel interakteeruvad moodustunud dimeerid omavahel. Seondumine toimub Sld5 ja Psf2 ning Psf1 ja Psf3 vahel subühikute N-terminaalsete piirkondade kaudu ning protsessi tulemusel tekib ringikujuline GINS kompleks (Joonis 4A). (Choi *et al.*, 2007)

Cdc45 puhul näitavad uuringud, et suure tõenäosusega on tegemist DHH fosfoesteraaside perekonda kuuluva ning täpsemalt *Escherichia coli* eksonukleaasi RecJ-ga suguluses oleva valguga (Krastanova *et al.*, 2012; Sanchez-Pulido ja Ponting, 2011). *E. coli* RecJ on rangelt üheaheelalise DNA spetsiifiline rekombinatsiooniline 5'-3' eksonukleas, mis ümbritseb lõigatavat DNA-d suletud rõngana (Krastanova *et al.*, 2012). Eukarüootide Cdc45 on struktuurilt siiski sarnane pigem arhede RecJ homologidele, kust on kadunud rõngast sulgevad domeenid (Joonis 4B) (Krastanova *et al.*, 2012). Lisaks on Cdc45 mitmete mutatsioonide tõttu katalüütilisi metallioone siduvates motiivides kaotanud nukleasse aktiivsuse (Krastanova *et al.*, 2012). Ehkki seejuures on valgul säilinud võime siduda üheaheelalist DNA-d (Krastanova *et al.*, 2012), näitavad viimased uuringud siiski, et Cdc45 tavapärase DNA kaksikheeliksi lahutamise juures olulist rolli ei mängi ning valgul võib olla hoopis funktsioon helikaasi tsentraalsest kanalist juhuslikult väljunud DNA sidumisel (Costa *et al.*, 2014).



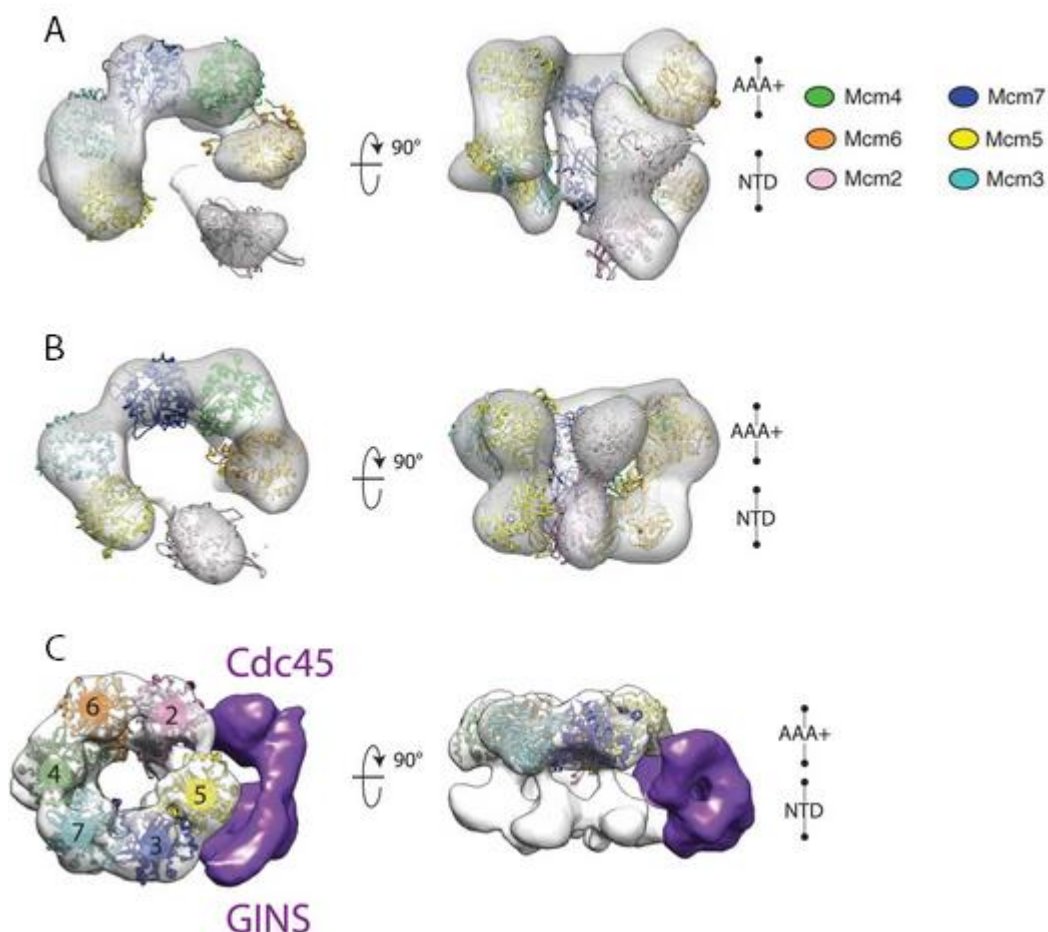
Joonis 4. Eukarüootse GINS kompleksi ning arhede RecJ homologide ruumilised struktuurid. (A) Inimese heterotetrameerne GINS kompleks. Ringikujuline kompleks koosneb subühikutest Sld5, Psf1, Psf2 ja Psf3. Vt täiendavaid selgitusi tekstist (Chang *et al.*, 2007). (B) Arhest *Thermus thermophilus* kristalliseeritud *Escherichia coli* eksonukleaasi RecJ homolog. Kuna mutatsioonid nukleolüütilisi metallioone siduvates domeenides suure

tõenäosusega valgu ruumilist struktuuri ei mõjuta, sarnaneb Cdc45 arvatavasti just arhede RecJ homoloogidele. Valk koosneb kahest domeenist (lilla ja sinine), mida ühendab α -heeliks (roheline). Üksikahelaline DNA paigutub arvatavasti domeenide vahelisse vaku (Krastanova *et al.*, 2012).

1.2.3 Replikatiivne CMG helikaas

Eukarüootides võib iseseisev Mcm2-7 heksameer eksisteerida kahes erinevas konformatsioonis: enamus kompleksist on spiraalses avatud (*spiral lock-washer*) ning väiksem osa planaarses piluga (*planar notched*) vormis (vastavalt joonised 5A, B) (Costa *et al.*, 2011). Seejuures paigutub avaus subühikute Mcm2 ja Mcm5 vahele, mille omavaheline interaktsioon võrreldes teiste subühikutega on märgatavalt nõrgem (Davey *et al.*, 2003). Mõlema konformatsiooni puhul on heksameeri interakteerumine DNA-ga nõrk ning arvatavasti on mitteoptimaalne ka aktiivtsentri komponentide paigutus, mistõttu ongi iseseisva Mcm2-7 kompleksi helikaasne aktiivsus piiratud (Costa *et al.*, 2011). Helikaasi aktiveerimine hõlmab kahe kofaktori, Cdc45 ja GINS kompleksi heksameerile seondumist, mis ühendavad subühikute Mcm2 ja Mcm5 vahelise avause (Joonis 5C). Ühel pool avaust seondub Cdc45 Mcm2 N-terminaalse domeeniga ning teisel pool GINS subühikute Psf2 ja Psf3 kaudu Mcm5 ja Mcm3 N-terminaalse A aladomeeniga. Lisaks interakteeruvad Cdc45 ja GINS tugevalt ka omavahel, mida GINS kompleksi poolt vahendab arvatavasti Psf2. Selliselt moodustub omamoodi „sild“, mis ühendab eraldatud subühikud ning stabiliseerib seeläbi planaarse piluga vormi. Rõnga täielik sulgumine on ATP-st sõltuv. ATP sidumisel läbib CMG konformatsioonilise muutuse, mille käigus kaob Mcm2/5 pilu, heksameer pinguldub ning GINS interakteerub subühikute Mcm3 ja Mcm5 AAA+ domeenidega. Seeläbi tekib CMG lukustatud vorm (joonis 5C). Arvatavasti loovad just need struktuursed muutused ATP hüdroolüüsiks optimaalse aktiivtsentri ning võimaldavad helikaasi tihedamat seondumist DNA-ga. (Costa *et al.*, 2011)

Kui tänaseks on pealiskaudsed teadmised CMG helikaasi aktiveerimise ja struktuuri kohta olemas, siis väga vähe on teada mehhanismi kohta, mille alusel helikaasikompleks replikatsiooni elongatsioonil DNA kaksikahelat denatureerib ning tekkinud DNA üksikahelad üksteisest ruumiliselt lahutab. Samuti on ebaselge, kuidas kompleks ATP hüdroolüüsil vabaneva energia vajalikuks mehaaniliseks energiaks konverteerib, et mööda DNA kaksikahelat suunatult liikuda.



Joonis 5. Eukariootne Mcm2-7 heteroheksameer ning CMG helikaasikompleks. (A) Iseseisev Mcm2-7 heksameer spiraalses avatud konformatsioonis pealt- (vasakul) ja külgvaates (paremal). Avaus paigutub subühikute Mcm2 ja Mcm5 vahele. AAA+ ja NTD tähistavad vastavalt piirkondi, kuhu paigutuvad heksmeeri subühikute AAA+ ja N-terminaalsed domeenid (Costa *et al.*, 2011) (B) Heksameer planaarses piluga konformatsioonis pealt- ning külgvaates (Costa *et al.*, 2011). (C) CMG helikaasikompleks lukustatud konformatsioonis pealt- ning külgvaates. Heksameeriga seonduvad Cdc45 ja GINS ühendavad subühikute Mcm2 ja Mcm5 vahele jääva avause ning stabiliseerivad helikaasi. Vt täiendavaid selgitusi tekstist (Costa *et al.*, 2014).

1.3 Replikatsiooni regulatsioon genotoksilise stressi tingimustes

Replikatsiooni viib läbi prereplikatiivsete komplekside aktiveerimise käigus moodustuv replisoom, mille koosseisu kuuluvad eukariootides replikatiivne CMG helikaas, erinevad DNA polümeraasid, DNA primaas, replisoomi ees liikuvad topoisomeraasid ning arvukad teised valgulised faktorid (MacNeill, 2012). Replisoomide liikumine on delikaatne protsess, mis nõuab kõikide komponentide koordineeritud koostööd ning mille funktsioneerimine võib mitmete tegurite mõjul häiruda. Replisoomide progresseerumist inhibeerivad erinevad mutatsioonid, valepaardumised või katked DNA-s (Zeman ja Cimprich, 2014), mille olulisimaks tekkemehhanismiks on genotoksiinide põhjustatud genotoksiline stress. Genotoksilisse stressi sattunud rakus on vajalik aeglustada replikatsiooni kulgu, et anda rakule

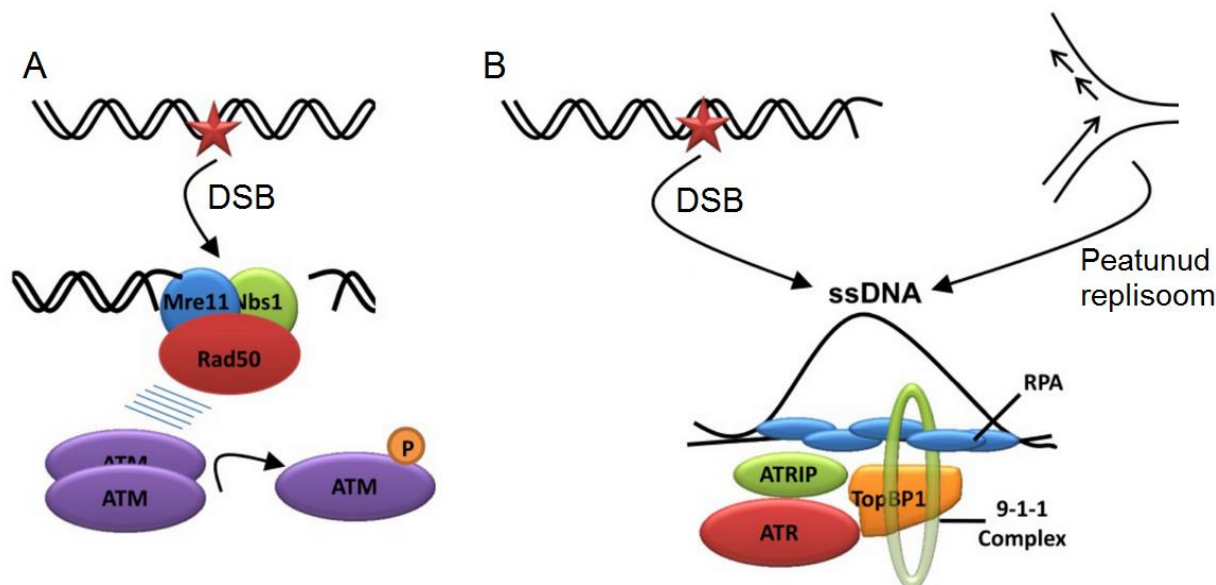
aega tekkinud kahjustuste kõrvaldamiseks ning poolelijäänud DNA sünteesi lõpetamiseks (Mazouzi *et al.*, 2014). See saavutatakse spetsiifiliste biokeemiliste radade abil, mida kollektiivselt nimetatakse S-faasi kontrollpunktiks.

1.3.1 S-faasi kontrollpunkti aktiveerimine

S-faasi kontrollpunkti vastuse keskpunktis asuvad kaks seriin/treoniin-spetsiifilist proteiinkinaasi ATR (ingl *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) ja ATM (ingl *Ataxia Telangiectasia mutated*), mille aktiveerumine vallandab rakus signaalide kaskaadi ja seeläbi S-faasi kontrollpunkti vastuse (Sancar *et al.*, 2004). ATR aktiveeritakse üheaahelalise DNA pikajalise rakus püsimise puhul (Cimprich ja Cortez, 2008). Üheaahelaline DNA võib muuhulgas tekkida näiteks kaheaahelaliste DNA katkete 5'-3' eksonukleolüütilisel töölusel, mis on oluline etapp katke parandamisel homoloogilise rekombinatsiooni kaudu (Lisby ja Rothstein, 2004). Olulisim tekkemehhanism on aga replisoomi tee jääv DNA kahjustus, mis tekitab enamasti olukorra, kus DNA polümeraas takerdub ning DNA süntees peatub, kuid helikaas jätkab DNA kaksikahela lahutamist (Pacek ja Walter, 2004). Mõlemal juhul tekivad pikad üheaahelalise DNA lõigud, millele seondub valk RPA (ingl *replication protein A*) (Joonis 6B) (Wold, 1997). Kui RPA tavafunktsioon on hoida vasteraldatud DNA üksikahelaid tagasi kokkukeerdumast, siis pikalt DNA-le jäädes hakkab sellele seonduma valk ATRIP (ingl *ATR-interacting protein*), millega on kompleksis kinaas ATR (Joonis 6B) (Cimprich ja Cortez, 2008). Kinaasi aktiveerimiseks on seejärel vajalikud RRH (Rad9-Rad1-Hus1) kompleks ning sellele seonduv TopBP1 (ingl *topoisomerase II-binding protein 1*), mis sisaldab ATR-i aktivatsioonidomeeni ning mis seostub otseselt ATRIP-ATR kompleksiga (Joonis 6B) (Cimprich and Cortez, 2008). Aktiveeritud ATR fosforüleerib mitmeid allavoolu jäävaid valke, millest olulisim on seriin/treoniin-spetsiifiline proteiinkinaas Chk1 (*checkpoint kinase 1*) (Cimprich ja Cortez, 2008).

ATM aktiveeritakse peamiselt kaheaahelaliste DNA katkete puhul (Lee ja Paull, 2005), ehkki on leitud ka DNA kahjustustest sõltumatuid aktiveerimismehhanisme (Guo *et al.*, 2010). Kaheaahelalised katked võivad tekkida erinevate väliste tegurite mõjul (nt ioniseeriv kiirgus, Sachs *et al.*, 1992), aga ka näiteks olukordades, kus rakk üritab peatunud replisoomi rekombinatsiooni abil päästa (Zeman ja Cimprich, 2014). Kinaasi aktiveerimist vahendab kaheaahelaliste katkete sensorkompleks MRN (Mre11-Rad50-Nbs1, Joonis 6A) (Lee ja Paull, 2005). Katke tekkimisel sellele seonduv MRN kompleks lahutab esmalt DNA kaksikheeliksi katke otsast ATP-st sõltuvalt ning lokaliseerib seejärel kahjustuskohta erinevad DNA

reparatsiooniensüümid (Cannon *et al.*, 2013). Samaaegselt aktiveerib MRN ATM kinaasi, mis eksisteerib tavaolekus inaktiivse dimeerina (Joonis 6A) (Lee ja Paull, 2005). Aktiivne ATM läbib esmalt autofosforüleerimise ning fosforüleerib seejärel mitmeid allavoolu jäävaid substraate, sealhulgas seriin/treoniin-spetsiifilist proteiinkinaasi Chk2 (Matsuoka *et al.*, 2007).



Joonis 6. S-faasi kontrollpunkti vastuskinaaside ATM-i ja ATR-i aktiveerimine. (A) ATM-i aktiveerimine. Inaktiivne dimeerne ATM aktiveeritakse kaheahelaliste DNA katkete (DSB) puhul MRN kompleksi poolt. Täiendavad selgitused tekstis. (B) ATR-i aktiveerimine. ATR aktiveeritakse vastusena üheaahelalise DNA pikaaegsele rakus püsimisele. Üheaahelaline DNA võib tekkida kaheahelaliste DNA katkete eksonukleolüütilisel töötusel või replisoomide seiskumisel. Täiendavad selgitused tekstis (Joaquin ja Fernandez-Capetillo, 2012).

1.3.2 Replikatsiooni regulatsioon S-faasi kontrollpunkti vastuskinaaside kaudu

S-faasi kontrollpunkti vastuskinaasid ATM ja ATR ning nendest allavoolu jäävad efektorkinaasid Chk1 ja Chk2 fosforüleerivad S-faasi kontrollpunkti aktiveerumisel tohtul hulgal erinevaid substraate, mille hulka kuuluvad muuhulgas erinevad transkriptsioonifaktorid, signaalradade komponendid ja DNA reparatsiooniensüümid (kokku üle 700 erineva valgu) (Matsuoka *et al.*, 2007). Replikatsiooni kontekstis modifitseeritakse seejuures mitmeid *origin*'ide aktiveerimisel osalevaid valke.

Hiljaaktiveeruvate *origin*'ide puhul on leitud mitmeid tõendeid, et S-faasi kontrollpunkt inhibeerib nende aktiveerimist. Esiteks fosforüleerib Rad53 (Chk1 homoloog pagaripärmis) initsiatsioonifaktorit Sld3, mis takistab selle interakteerumist Dpb11 ja Cdc45-ga, ning samuti valku Dbf4, inhibeerides sellega DDK aktiveerumist (Zegerman ja Diffley, 2010). On tõendeid, et sarnane mehhanism võib toimida ka kõrgemates taksonites (Zegerman ja Diffley, 2010). Teiseks on inimeses kirjeldatud Chk1-st sõltuvat Cdc25A fosfataasi degradeerimist,

mis on oluliseks CDK aktivaatoriks (Falck *et al.*, 2001). Võib arvata, et hiliste *origin*'ide aktiveerimise inhibeerimise eesmärk on aeglustada üldist replikatsiooni kulgu ning anda seeläbi rakule kahjustuste kõrvaldamiseks aega (vt Mazouzi *et al.*, 2014). Samas on senimaani selgusetu, kas sellisel replikatsiooni pidurdamisel peatatakse ka juba aktiveerunud ja funktsionaalsed replisoomid. Juhul kui see nii on, võiks see toimuda replisoomi „mootori“, CMG helikaasi peatamise kaudu, kuna see tooks automaatselt kaasa kogu replisoomi seiskumise ning välistaks eelpoolkirjeldatud olukorra, kus vaatamata peatunud polümeraasile jätkab helikaas DNA lahutamist. Sellise mehhanismi võimalikkusele vihjabki hiljutine uurimus, kus näidati, et hariliku äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) Chk2 fosforüleerib mitmeid CMG subühikuid, inhibeerides sellega helikaasi aktiivsust (Ilves *et al.*, 2012). Ehkki erinevate CMG kompleksi subühikute fosforüleerimist S-faasi kontrollpunkti vastuskinaaside ja *checkpoint*-kinaaside poolt on näidanud veel arvukad teisedki uurimused (vt Cortez *et al.*, 2004; Ishimi *et al.*, 2003; Matsuoka *et al.*, 2007; De Piccoli *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2007), on vastavate modifikatsioonide funktsioonid senini suuresti teadmata.

Samaaegselt replikatsiooni aeglustamisega on vaja lahendada probleem, mis S-faasi kontrollpunkti vastuse esialgselt põhjustas – DNA kahjustus ja selle tulemusel peatunud replisoom. Kui kahjustuse likvideerimine tavapäraste DNA reparatsioonimehhanismide abil ei õnnestu, võib seiskunud replisoomi taaskäivitada muuhulgas *translesion* DNA sünteesi, matriitsahela rekombinatsioonilise vahetuse või ka näiteks DNA polümeraasi kahjustuspiirkonnast üle „hüppamise“ teel (Zeman ja Cimprich, 2014). Siiski ei pruugi replisoomi sellisel kujul „päästmine“ olla alati võimalik, mistõttu seisavad rakud fundamentaalse probleemi ees, kuna, nagu eelpool mainitud, ei ole *origin*'ide litsentseerimine S-faasis enam võimalik. Antud kitsaskoht lahendatakse prereplikatiivsete komplekside kromatiinile ülehulgas laadimisega (vt peatükk 1.1.1), mis võimaldab seiskunud replisoomile lähedalasuval pre-RC-l lõpetada replitseerimata DNA süntees (Yekezare *et al.*, 2013). Seejuures tekib konflikt, kuna S-faasi kontrollpunkt inhibeerib *origin*'ide aktiveerimist. Kuidas eristatakse lokaalselt aktiveerimist vajavaid komplekse teistest, on täpselt teadmata. Ühe võimaliku seletuse pakub siiski Chk1 ja ATR-i erinevus – kui Chk1 liigub rakutuumas vabalt ringi, siis ATR on seotud ATRIP-i ja seega kahjustuskoha kromatiiniga (Cimprich ja Cortez, 2008). Nii saab ATR teoreetiliselt lokaalselt Chk1 inhibitsioonisignaali annulleerida (Cimprich ja Cortez, 2008). On näidatud, et ATR ning ka ATM fosforüleerivad CMG subühikut Mcm2 (Yoo *et al.*, 2004), luues sellega seondumiskoha kinaasile Plk1 (ingl *polo-like kinase 1*) (Trenz *et al.*, 2008). Plk1 on seejärel võimeline replikatsiooni läbiviimist reguleerima (Trenz *et al.*, 2008), kuid antud raja täpne mehhanism on praegu veel ebaselge.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Ilves *et al.* (2012) on näidanud, et hariliku äädikakärbse rakutsükli kontrollkinaas Chk2 inhibeerib replikatiivset CMG helikaasi antud kompleksi kuuluvate valkude Mcm3, Mcm4 ning Psf2 (Gins2) fosforüleerimise kaudu. Detailsel kaardistamisel leiti, et valgus Psf2 asuvad sihtmärkaminoahappejäägid subühiku C-terminaalses ning Mcm4 puhul valgu N-terminaalses otsas. Käesoleva bakalaureusetöö lähtepunktiks oli huvi uurida, kas selline CMG helikaasi aktiivsuse reguleerimine *checkpoint*-kinaaside kaudu toimub analoogselt ka kõrgemates eukarüootides, täpsemalt inimeses (*Homo sapiens*) ja koduhiires (*Mus musculus*). Hõlbustamaks ja kiirendamaks võimalike fosforüleeritavate piirkondade kaardistamist, otsustati kasutada trunkeeritud valke, kus oletatavad kinaasi poolt fosforüleeritavad piirkonnad olid eemaldatud.

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- Valmistada inimese ja koduhiire rekombinantseid valke Mcm4 Δ N, Gins2 Δ C ja Mcm4N-term ekspresseerivad bakuloviirused.
- Ekspresseerida ning puhastada inimese ja hiire Mcm4 Δ N subühikut sisaldavad Mcm2-7 kompleksid ning iseseisvad Mcm4 N-terminused.
- Analüüsida puhastatud valkude fosforüleerimist Chk1 kinaasi poolt.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Rakuliinid ja söötmed

PCR-i abil amplifitseeritud nukleotiidsete järjestuste kloonimiseks kasutati *E. coli* tüve DH5 α (fhuA2, lac(del)U169, phoA, glnV44, Φ 80', lacZ(del)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17, valmistanud Nele Tamberg). Rekombinantse bakmiidse DNA valmistamiseks transformeeriti pFastBacTM 1 konstruktid *E. coli* tüvesse DH10BacTM (F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ -, rpsL, nupG/pMON14272/pMON7124, Invitrogen). Rekombinantseid valke ekspresseerivate bakuloviiruste valmistamiseks ning valkude ekspresseerimiseks kasutati *Spodoptera frugiperda* rakuliini Sf9.

Transformeeritud *E. coli* tüvesid DH5 α ja DH10Bac[™] inkubeeriti loksutil SOC söötmes (SOB sööde, ingl *super optimal broth*, 0,5% pärmiekstrakt, 2% trüptoon, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, kuhu on lisatud 20 mM glükoos). Bakterirakkude plaatimiseks ning vedelsöötmena minipreppeareerimistel kasutati LB (ingl *lysogeny broth*) söödet (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl-i). Söötmete valmistamiseks kasutatud kontsentraadid olid tellitud firmalt Becton Dickinson and Company (USA), DH10Bac[™] rakkude inkubeerimiseks kasutatud SOC sööde saadi firmalt Invitrogen. Sf9 rakke kasvatati EX-CELL[®] 420 seerumivabas söötmes (Sigma-Aldrich, USA).

2.2.2 Kloneerimine

Rekombinantseid valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste valmistamiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni. Vajaminevad *forward* ja *reverse* praimerid disainiti või kasutati juba laboris olemasolevaid primereid (Tabel 1). Oligonukleotiide analüüsiti programmiga OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, USA). PCR-i produktide restrikteerimise võimaldamiseks lisati hiire *forward* praimerite 5' otsa restriктаas EcoRI ning *reverse* praimerite 5' otsa XhoI äratundmisjärjestus ning inimese *forward* ja *reverse* praimerite 5' otsa vastavalt BamHI ja XhoI äratundmisjärjestus. Mcm4 N-terminuste *forward* praimeritele lisati hilisemaks valgupuhastuseks vajalik FLAG-afiinsusmärgist kodeeriv järjestus. Kõik oligonukleotiidid telliti firmalt Microsynth (Balgach, Šveits).

PCR-i reaktsioonisegu (50 μ l) sisaldas 10 μ l 5x HF puhvrit (puhvri koostises 7,5 mM MgCl₂, Thermo Scientific, USA), 0,2 mM dNTP segu, 1 U Phusion[®] DNA polümeraasi (Thermo Scientific), 0,5 μ M *forward* ja *reverse* primereid, ligikaudu 30 ng matriits-DNA-d ning lõppmahuni Milli-Q vett. Inimese järjestuste amplifitseerimiseks kasutati laborilt Dana-Farber/Harvard Cancer Center DNA Resource Core (Harvardi Meditsiinikool, USA) tellitud plasmide, mis sisaldasid vastava valgu cDNA järjestust (pBluescript-MCM4, ID: HSCD00337037 ja pOTB7-GINS2, ID: HSCD00324446). Hiire järjestuste amplifitseerimisel kasutati matriitsina Mcm4 ja Gins2 järjestusi sisaldanud pFastBac[™]1 plasmide, mille oli eelnevalt valmistanud Sandra Koit (avaldamata). PCR-i reaktsioonid viidi läbi programmeeritavas termotsükleris *TProfessional Thermocycler* (Biometra, Saksamaa), kasutades järgmist programmi:

Algne denaturatsioon: 98 °C 30 sekundit

Denaturatsioon: 98 °C 10 sekundit

Praimerite seondumine ja DNA süntees: 72 °C 50 sekundit

} 30 tsüklit

Lõppekstensioon: 72 °C 5 minutit

Tabel 1. Rekombinantseid valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste valmistamiseks kasutatud oligonukleotiidid. Tabelis on näidatud polümeraasi ahelreaktsioonil kasutatud *forward* ja *reverse* praimerid ning vastavate insertide pikkused plasmiidis. Iga praimeripaari puhul on esimesena toodud *forward* (Mcm4 N-terminuste puhul esimesed kaks rida), teisena *reverse* praimer. Joonega on märgitud praimerite otstesse lisatud restriктаaside äratundmisjärjestused: hiire *forward* praimerite puhul EcoRI ja *reverse* praimerite puhul XhoI, inimese praimeritel vastavalt BamHI ja XhoI. Sinisega on tähistatud FLAG-afiinsusjärjestust kodeeriv järjestus. Mm – *Mus musculus*, Hs – *Homo sapiens*, ap – aluspaar.

Plasmiid	Kasutatud oligonukleotiidid (5'-3')	Inserti pikkus (ap)	Praimer disainitud antud töö raames
MmMcm4ΔN	GCGAATTCATGTGGGGAACAGATGTGAATGTG GCCTCGAGTCAGAGCAGGCGGACAGTCTTCC	2139	Jah Ei
MmMcm4N-term	ATGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG GGCGCTATGTCGTCCCCGGCATCCAC GCCTCGAGTCAAATCACAAGCTTTTGGCCTAGAG	489	Jah Jah
MmGins2ΔC	GCGAATTCATGGATGCGGCCGAGGTG ATCTCGAGTCAGCGGAGCTTGTACATGTGGTTG	516	Ei Jah
HsMcm4ΔN	TAGGATCCATGTGGGGAACAGATGTAAATG ATCTCGAGTCAGAGCAAGCGCACGGT	2139	Ei Jah
HsMcm4N-term	TAGGATCCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG GGCGCTATGTCGTCCCCGGCGTCGAC GCCTCGAGTCAGATCACAAGTTTGGCCTAG	492	Jah Jah
HsGins2ΔC	TAGGATCCATGGACGCTGCCGAGG ATCTCGAGTCAGCGGAGTTTGTACATGTGG	516	Ei Jah

Reaktsiooniproduktid lahutati geelelektroforeesil 1% agarosgeelis TAE (Tris-atsetaat-EDTA) puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Saadud DNA fragmendid lõigati geelist välja ning puhastati NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up komplektiga (Macherey-Nagel, Saksamaa), järgides tootjapoolset juhendit.

Puhastatud DNA fragmendid kloneeriti järgnevalt pFastBac™1 vektorisse. Selleks lõigati nii

PCR-i abil amplifitseeritud fragmente kui plasmidi vastavate restriктаasidega. Fragmentide restrikteerimisel sisaldas restriksioonisegu 20 µl geelist puhastatud DNA-d, 3 µl 10x *FastDigest* puhvrit (Thermo Scientific), 1 µl kumbagi restriктаasi (hiire konstruktide puhul EcoRI ja XhoI, inimese konstruktide puhul BamHI ja XhoI) ning 30 µl lõppmahuni *Milli-Q* vett. Vektori lõikamisel sisaldas reaktsioonisegu ligikaudu 600 ng pFastBacTM1 plasmidi, 2 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 0,5 µl kumbagi restriктаasi (vastavalt kas EcoRI ja XhoI või BamHI ja XhoI) ning 20 µl lõppmahuni *Milli-Q* vett. Proove inkubeeriti 37 °C juures üks tund. Lõigatud fragmendid puhastati otse restriksioonisegust, kasutades NucleoSpin[®] *Gel and PCR Clean-up* komplekti vastavalt tootja juhendile. Vektorit töödeldi lisaks *FastAP* aluselise fosfataasiga (Thermo Scientific): restriksioonisegule lisati 1 U aluselist fosfataasi ning inkubeeriti 10 minutit 37 °C juures, pärast mida tõsteti temperatuur 5 minutiks 75 °C-ni, et ensüüm inaktiveerida. Restrikteeritud vektorid lahutati 0,8% agarosgeelis TAE puhvris ning saadud fragmendid lõigati geelist välja ja puhastati NucleoSpin[®] *Gel and PCR Clean-up* komplektiga, järgides tootja juhendit. Kõikide käesolevas töös läbiviidud restriksioonide puhul kasutati firma Thermo Scientific *FastDigest* restriктаase.

Saadud restrikteeritud fragmendid ning vastavad pFastBacTM1 vektorid ligeeriti järgnevalt omavahel kokku. Iga ligatsioonisegu (20 µl) sisaldas 0,5 µl eelnevalt kas EcoRI ja XhoI või BamHI ja XhoI-ga lõigatud vektorit, 3 µl vastavate restriктаasidega lõigatud inserti, 2 µl 10x T4 DNA ligaasi puhvrit (Thermo Scientific), 5 Weiss U T4 ligaasi (Thermo Scientific) ja lõppmahuni *Milli-Q* vett. Proove inkubeeriti 16 °C juures üleöö.

Ligatsiooniproduktid transformeeriti seejärel *E. coli* tüvesse DH5α. Kompetentsed rakud (säilitatud temperatuuril -80 °C) sulatati jääl ning transformatsiooni kohta segati kokku 50 µl rakke ja 5 µl ligatsioonisegu. Rakke hoiti järgnevalt 30 minutit jääl neid iga 10 minuti tagant kergelt segades, pärast mida tehti neile 90 sekundi jooksul 42 °C juures kuumašokk. Rakud asetati seejärel viieks minutiks tagasi jääle, lisati 450 µl SOC söödet ning inkubeeriti loksutis üks tund 37 °C juures. Rakud plaaditi kahes osas – esmalt 50 µl (1/10 rakususpensioonist), misjärel ülejäänud rakud fuugiti Heraeus Pico 17 mikrotsentrifuugis (Thermo Scientific, antud tsentrifuugi kasutati kõikide käesolevas töös teostatud mikrotsentrifuugimiste puhul) 2 min 3000 rpm. Suurem osa supernatandist eemaldati, põhja fuugitud rakud resuspendeeriti allesjäänud ligikaudu 50 µl söötmes ning plaaditi. Rakud plaaditi 100 µg/ml ampitsilliini sisaldanud LB agarile, tasse inkubeeriti 37 °C juures 16 tundi.

Igalt tassilt koguti miniprepareerimiseks kaks kolooniat, mis viidi edasi katseklaasides olnud

LB vedelsöötmesse (3 ml), kuhu oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini. Katseklaase inkubeeriti loksutis temperatuuril 37 °C 16 tundi, misjärel rakud fuugiti mikrotsentrifuugis 2 min 3000 rpm. Sööde eemaldati ning plasmiidne DNA eraldati FavorPrep[™] *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* komplektiga (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) vastavalt tootjapoolsele juhendile.

Saadud rekombinantseid vektoreid kontrolliti restriksioonanalüüsiga. Restriksioonisegu (20 µl) sisaldas ligikaudu 1 µg puhastatud DNA-d, 2 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 0,3 µl igat restriктаasi ning lõppmahuni *Milli-Q* vett. Restriksiooniproduktid lahutati geelelektroforeesil 1% agarosgeelis TAE puhvris. Korrekse tulemuse andnud plasmiidid saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse. Sekveneerimise tulemusi analüüsiti programmiga Clone Manager (Sci-Ed Software, USA)

2.2.3 Rekombinantse bakmiidse DNA valmistamine

Rekombinantse bakmiidse DNA (bakmiidi) saamiseks transformeeriti rekombinantsed pFastBac[™]1 vektorid *E. coli* tüvesse DH10Bac[™]. Kompetentsed rakud sulatati jääs ning iga transformatsiooni kohta segati kokku 30 µl rakke ja ligikaudu 10 ng plasmidi. Rakke inkubeeriti 30 minutit jääs, misjärel tehti neile 45 sekundi jooksul 42 °C juures kuumašokk. Rakud viidi seejärel 2 minutiks uuesti jääle, lisati 300 µl SOC söödet ning inkubeeriti loksutis temperatuuril 37 °C neli tundi. Kõikidest proovidest tehti lahjenduste read lõpplahjendustega 1/10 ja 1/100, mõlemat lahjendust plaaditi 50 µl. Rakud plaaditi LB agarile, kuhu oli lisatud 50 µg/ml kanamütsiini, 40 µg/ml gentamütsiini, 10 µg/ml tetratsükliini, 100 µg/ml Bluo-gal-i (5-bromo-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiid) ja 40 µg/ml IPTG-d. Tasse hoiti valguse eest kaitstult viis päeva toatemperatuuril.

Kõikidelt 1/10 lahjendusega tassidelt koguti miniprepareerimiseks üks valge koloonia, mis viidi edasi katseklaasidesse LB vedelsöötmesse (3ml), kuhu oli lisatud 50 µg/ml kanamütsiini, 40 µg/ml gentamütsiini ja 10 µg/ml tetratsükliini. Katseklaase inkubeeriti loksutil 37 °C juures 20 tundi.

Rekombinantse bakmiidi puhastamiseks bakterirakkudest fuugiti rakususpensiooni mikrotsentrifuugis 1 min 13 300 g. Supernatant eemaldati ning sade resuspendeeriti 300 µl lahuses I (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaaS A-d). Lisati 300 µl lahust II (0,2 N NaOH, 1% SDS), segati kergelt ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, mille tulemusel muutus suspensioon läbipaistvaks. Seejärel lisati 300 µl 3M kaaliumatsetaati

(pH 5,5) ning segati koheselt ettevaatlikult. Tekkis valge sade. Proove inkubeeriti 10 min jääl ning fuugiti mikrotsentrifuugis 10 min 13 300 g. Supernatant viidi uude mikrotsentrifuugituubi, kuhu oli eelnevalt valatud 800 µl isopropanooli, segu segati kergelt. Proove inkubeeriti jääl 10 min ning fuugiti mikrotsentrifuugis 15 min 13 300 g. Supernatant eemaldati, lisati 500 µl 70% etanooli, segati korralikult sademe pesemiseks ning fuugiti mikrotsentrifuugis 5 min 13 300 g. Etanool eemaldati, sademel lasti õhu käes 5 minutit kuivada ning sade lahustati 40 µl 1x TE puhvris (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA). Bakmiide säilitati +4 °C juures.

Soovitud järjestuste esinemist bakmiidis kontrolliti PCR-iga. Reaktsioonisegu (50 µl) sisaldas 10 µl 5x HF puhvrit, 0,2 mM dNTP segu, 0,5 U Phusion[®] DNA polümeraasi, 100 ng puhastatud bakmiidset DNA-d, 0,5 mM kumbagi kloneerimispraimerit, lõppmahuni *Milli-Q* vett. Reaktsioonid viidi läbi programmeeritavas termotsükleris *TProfessional thermocycler*, kasutades eelpoolkirjeldatud programmi.

2.2.4 Sf9 rakkude transfektsioon ja rekombinantsete bakuloviiruste kogumine

Sf9 rakkude transfekkeerimiseks plaaditi ligikaudu tund enne transfektsiooni kuue auguga plaadile (augu diameeter 3,5 cm) augu kohta 2×10^6 Sf9 rakku 2 ml-s EX-CELL[®] 420 söötmes. Transfektsiooniks segati ühes mikrotsentrifuugituubis iga transfektsiooni kohta ligikaudu 5 µg bakmiidset DNA-d (TE puhvris) ja 25 µl steriilset *Milli-Q* vett. Teises tuubis segati transfektsiooni kohta 2 µl reagenti 007 (Icosagen, Eesti) ja 18 µl steriilset *Milli-Q* vett. Seejärel lisati reagenti lahus igasse DNA lahuse tuubi, pipeteeriti 5 korda õrnalt edasi-tagasi ning hoiti 10 minutit toatemperatuuril, et lasta tekkida DNA/reagenti kompleksidel. DNA/reagenti segu lisati seejärel rakkude söötmesse ning segati õrnalt. Sf9 rakke inkubeeriti kõikides käesolevas töös läbiviidud katsetes 27 °C juures.

Esimese passaaži (P1) viirusvaru koguti neli päeva pärast transfekkeerimist. Viiruspartikleid sisaldav sööde eemaldati rakkudelt, kanti edasi tsentrifuugituubi ning fuugiti tsentrifuugis 5810 R (Eppendorf, Saksamaa) rootoriga A-4-81 (Eppendorf) toatemperatuuril 5 min 1500 rpm. Viirusosakesi sisaldav sööde viidi edasi puhtasse 15 ml tsentrifuugituubi ning säilitati pimedas +4 °C juures.

Sf9 rakud koguti 4,4 ml PBS (ingl *phosphate-buffered saline*) puhvris (137 mM NaCl, 2,7

mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄). Rakususpensioonist võeti 100 µl proov, mis fuugiti mikrotsentrifuugis 1 min 2500 rpm. Seejärel eemaldati 50 µl supernatanti, rakud resuspendeeriti ülejäänud PBS puhvris ning proovile lisati 10 µl 6x Laemmli SDS puhvrit (60% glütserool, 300 mM Tris, pH 6,8; 12 mM EDTA, pH 8,0; 12% SDS, 864 mM β-merkaptoetanol, 0,05% bromofenoolsinine, valmistanud Carmen Kivisild). Proove keedeti 5 minutit 100 °C juures. P1 rakulüsaati säilitati temperatuuril -20 °C.

Järgnevalt amplifitseeriti kogutud P1 viirusvaru viiruse tiitri suurendamiseks kahes korduses. Teise passaaži (P2) viirusvaru saamiseks plaaditi ligikaudu tund enne nakatamist 10 cm diameetriga tassidele $8,8 \times 10^6$ Sf9 rakku 10 ml EX-CELL[®] 420 söötmes. Kui rakud olid kinnitunud, lisati söötmesse 200 µl P1 viirusvaru ning segati koheselt. Jälgiti nakatunud fenotüübi tekkimist (nakatunud rakud muutusid selgelt ümaramaks, diameeter suurenes, rakud tulid tassi küljest lahti). Viirus ja Sf9 rakud koguti kolme päeva pärast sarnaselt P1 viirusvarule. Viirust säilitati pimedas +4 °C, P2 rakulüsaati -20 °C juures.

Kolmanda passaaži (P3) viirusvaru saamiseks plaaditi tund enne nakatamist 15 cm diameetriga tassidele $2,2 \times 10^7$ Sf9 rakku 30 ml EX-CELL[®] 420 söötmes või 10 cm diameetriga tassidele 1×10^7 rakku 10 ml söötmes (Mcm4 N-terminused). Kui rakud olid kinnitunud, lisati söötmesse 200 µl P2 viirusvaru ning segati koheselt. Jälgiti nakatunud fenotüübi tekkimist. Kuna P3 viirusvaru kasutati edasi ekspressiooniks, koguti lisaks valke Mcm4ΔN ja Mcm4N-term ekspresseerivatele bakuloviirustele ka teisi inimese ja hiire Mcm2-7 komplekside subühikuid (va Mcm4) ekspresseerivate viiruste P3 varud. Kasutatud P2 viirusvaru oli eelnevalt valmistanud S. Koit (avaldamata). Mcm2-7 komplekside puhul kasutati nende hilisema puhastamise võimaldamiseks FLAG-afiinsusjärjestusega Mcm3 ekspresseerivat bakuloviirust.

Viirus koguti neli päeva pärast nakatamist sarnaselt P1 ja P2 viirusvarule, kanti edasi puhtasse tsentrifuugituubi ning kasutati koheselt ekspressiooniks nakatamiseks.

2.2.5 Valkude ekspresseerimine

Mcm2-7 (4ΔN) komplekside ekspresseerimiseks segati 1-liitrisel kolvis kokku eelnevalt kogutud P3 viirusvarud (Mcm2, FLAG-Mcm3, Mcm4ΔN, Mcm5, Mcm6 ja Mcm7). Viirustele lisati Sf9 rakud lõppkontsentratsiooniga 1×10^6 rakku/ml ning sööde lõppmahuni

600 ml. Rakususpensioon jagati 300 ml kaupa kahte liitrisse kolbi ning rakke inkubeeriti loksutil 27 °C juures kolm päeva.

Mcm4 N-terminuste ekspresseerimiseks segati 0,5-liitrisel kolvis kokku vastav P3 viirusvaru, Sf9 rakud lõppkontsentratsiooniga 1×10^6 rakku/ml ning sööde lõppmahuni 100 ml. Rakke inkubeeriti sarnaselt eelpoolkirjeldatule.

Rakususpensioon koguti kolm päeva pärast nakatamist, kanti 400 ml tsentrifuugipudelitesse ning fuugiti A6.9 rootoriga (Herolab, Saksamaa) tsentrifuugis Sorvall™ RC-5B Plus (Kendro Laboratory Products, USA) 4 °C juures 10 min 3000 rpm. Sööde eemaldati ning sadestatud rakke pesti loksutades ~20 ml jääkülmas PBS puhvris, kuni sade põhja küljest lahti tuli. Suspensioon pipeteeriti 50 ml tsentrifuugituubi ning fuugiti A-4-81 rootoriga tsentrifuugis 5810 R 4 °C juures 7 min 1000 rpm. Supernatant eemaldati ettevaatlikult ning sade resuspendeeriti 30 ml (Mcm4 N-terminuste puhul 5 ml) 15 mM hüpotoonilises KCl lüüsi puhvris (25 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,02% Tween-20, 10% glütserool), kuhu oli lisatud 2 mM β-merkaptopetanol, 0,4 mM PMSF (ingl *phenylmethylsulfonyl fluoride*, fenüülmetüülsulfonüülfluoriid) ja 1x cOmplete proteaasi inhibiitori kokteil (Hoffmann-La Roche, Šveits). Lüüsitud rakud kanti edasi 15 ml tsentrifuugituubidesse ning külmutati vedelas lämmastikus. Proove säilitati -80 °C juures.

2.2.6 FLAG-afiinsuskromatograafia

Kõik järgnevad valgupuhastusetapid viidi läbi 4 °C juures. Valkude puhastamiseks rakuekstraktist sulatati eelnevalt kogutud rakulüsaat keeduklaasis toatemperatuuril olevas destilleeritud vees ning asetati enne täielikku sulamist jääle. Segu homogeniseeriti Dounce homogenisaatoris (Kimble Chase, USA) 18 löögiga, kasutades B nuia ning pipeteeriti ümber 50 ml ümarapõhjalisse tsentrifuugituubi. Lisati hüpotooniline KCl lüüsi puhver (Mcm2-7 komplekside puhul 100 mM, Mcm4 N-terminuste puhul 250 mM lõppkontsentratsioonini) ning inkubeeriti 15 minutit jääs. Lüsaat fuugiti Sorvall™ SS-34 rootoriga (Thermo Scientific) tsentrifuugis Sorvall™ RC-5B Plus 4 °C juures 10 min 10 000 rpm, supernatant pipeteeriti ümber puhtasse ümarapõhjalisse tsentrifuugituubi ning fuugiti uuesti sama rootoriga 4 °C juures 10 min 16 000 rpm. Supernatant pipeteeriti ümber 50 ml tsentrifuugituubi.

FLAG-afiinsuskromatograafia jaoks valmistati ette Bio-Radi (USA) Poly-Prep® kromatograafiakolonnid (10 ml). Kolonni kohta kasutati 300 µl ANTI-FLAG® M2 maatriksit

(Sigma-Aldrich). Mcm2-7 komplekside puhul pesti maatriksit esmalt ühe kolonni ruumala PBS puhvriga ning seejärel kahe kolonni ruumala 100-C puhvriga (25 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 100 mM KCl, 0,02% *Tween*-20, 10% glütserool), kuhu oli lisatud 2 mM β -merkaptotetanool ja 0,4 mM PMSF. Mcm4 N-terminuste puhul pesti maatriksit esmalt ühe kolonni ruumala PBS puhvriga ning seejärel kahe kolonni ruumala 250-C puhvriga (25 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 250 mM KCl, 0,02% *Tween*-20, 10% glütserool), kuhu oli samuti lisatud 2 mM β -merkaptotetanool ja 0,4 mM PMSF.

Fuugitud ekstrakt lisati pestud ANTI-FLAG[®] M2 maatriksile ja lasti kaks korda läbi joosta. Mcm2-7 komplekside puhul pesti kolonni seejärel kaks korda 5 ml 100-C puhvriga (lisatud 2 mM β -merkaptotetanool ja 0,4 mM PMSF) ning 3 ml puhver A-ga (100 mM NaOAc; 25 mM Hepes, pH 7,6, 10 mM Mg(OAc)₂, 10% glütserool), kuhu oli lisatud 0,2 mM PMSF, 1 mM DTT ja 250 μ g/ml insuliini (rekombinantne inimese insuliin, Sigma-Aldrich). Mcm4 N-terminuste puhul pesti kolonni kaks korda 3 ml 250-C puhvriga (lisatud 2 mM β -merkaptotetanool ja 0,4 mM PMSF), seejärel 3 ml 100-C puhvriga (lisatud samuti 2 mM β -merkaptotetanool ja 0,4 mM PMSF) ning viimaks 3 ml puhver A-ga (lisatud 0,2 mM PMSF, 1 mM DTT ja 250 μ g/ml insuliini). Seejärel elueeriti maatriksile seondunud valgud viis korda 300 μ l elueerimispuhvriga (puhver A, kuhu oli lisatud 0,2 mM PMSF, 1 mM DTT, 250 μ g/ml insuliini, 1x *cOmplete* proteaasi inhibiitori kokteil ning 100 μ g/ml FLAG peptiidi (Thinkpeptides, USA). Esimene eluaat koguti kohe, kõikide järgnevate elueerimiste puhul lasti elueerimispuhvril kolonnis 10 minutit seista. Igast elueeritud proovist võeti 10 μ l alikvoot, lisati 2 μ l Laemmli 6x SDS puhvrit ning keedeti 5 minutit temperatuuril 100 °C. Puhastatud valke analüüsiti SDS-PAGE geelelektroforeesil 8% (Mcm2-7) või 15% (Mcm4N-term) polüakrüülamiidgeelis 1x SDS jooksupuhvris (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS). Alikvoote säilitati -80 °C juures.

2.2.7 Geelfiltratsioon

FLAG-afiinsuskromatograafia abil rakuekstraktist eraldatud Mcm2-7 (4 Δ N) komplekse kromatografeeriti mittetäielikest kompleksidest vabanemiseks Superdex[™] 200 10/300 GL kolonnis (24 ml, GE Healthcare, Suurbritannia), kasutades ÄKTAmicro kromatograafi (GE Healthcare). Nii inimese kui hiire kompleksi puhul laeti kolonnile 300 μ l FLAG-afiinsuskromatograafiakolonnist elueeritud fraktsiooni 2 ja 200 μ l fraktsiooni 3, misjärel proove voolutati ühe kolonni ruumala puhver A-ga (lisatud 0,2 mM PMSF, 1 mM DTT ja 250 μ g/ml insuliini). Elueeritud proovid koguti 750 μ l alikvootide kaupa. Mcm2-7 komplekside

väljumist hinnati eelnevalt samadel tingimustel kolonnis lahutatud suurusmarkerite alusel (türoglobuliin, 669 kDa (Sigma-Aldrich), BSA (ingl *bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin), 67 kDa (Thermo Scientific) ja süsihappeanhüdraas, 20 kDa (Sigma-Aldrich). Võimalikke tervikkompleksi sisaldavaid fraktsioone analüüsiti SDS-PAGE geelelektroforeesil 8% polüakrüülamiidgeelis 1x SDS jooksupuhvris.

2.2.8 Mcm2-7 (4ΔN) komplekside kontsentreerimine

Nii inimese kui hiire Mcm2-7 (4ΔN) kompleksi kontsentratsioon osutus *in vitro* kinaasikatsetes kasutamiseks liialt madalaks ning kompleksid vajasid kontsentreerimist. Inimese Mcm2-7 kompleksi puhul kasutati kontsentreerimiseks Superdex™ 200 kolonnist kogutud fraktsioone 3, 4 ja 5 (kokku 2,25 ml), hiire kompleksi puhul fraktsioone 3 ja 4 (1,5 ml). Proovid laeti Amicon® Ultra-4 tsentrifuugituubidesse (Merck Millipore, USA) ning fuugiti A-4-81 rootoriga tsentrifuugis 5810 R 4 °C juures 25 min 2000 g. Kontsentreerimise lõpuks oli mõlema kompleksi puhul lahuse ruumala ligikaudu 150 µl.

2.2.9 Mcm4 N-terminuste fosfataasitöötlus

Mcm4 N-terminuste töötlemiseks fosfataasiga lisati 9 µl FLAG-afiinsuskromatograafiakolonnist elueeritud fraktsioonile nr 2 1 µl 10x MnCl₂ (Santa Cruz Biotechnology, USA) ning 1 U λ-fosfataasi (Santa Cruz Biotechnology). Kontrollreaktsioonis lisati fosfataasi asemel samas ruumalas Milli-Q vett. Reaktsioonid segati kokku jääs, misjärel inkubeeriti neid toatemperatuuril 30 minutit. Seejärel lisati igale reaktsioonile 2 µl 6x Laemmli SDS puhvrit ning keedeti 100 °C juures 5 min. Proove analüüsiti SDS-PAGE geelelektroforeesil 15% polüakrüülamiidgeelis 1x SDS jooksupuhvris.

2.2.10 In vitro kinaasikatsed

In vitro kinaasikatsetes kasutatud substraatvalkude kontsentratsioonide määramiseks võrreldi substraatvalkude signaalide intensiivsust teadaolevate valgukoguste signaalide intensiivsusega Coomassie'ga värvitud polüakrüülamiidgeelil. Mcm2-7 (4ΔN) komplekside koguse hindamiseks kasutati teadaoleva kontsentratsiooniga hariliku äädikakärbse Mcm2-7 kompleksi lahjendusterida, Mcm4 N-terminuste puhul BSA (ingl *bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin) lahjendusterida. Kontsentratsioonid leiti kalibreerimisgraafikult. Signaalide aktiivsus määrati programmiga ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Kõikide kinaasikatsete puhul oli reaktsioonimahuks 12 µl. Reaktsioonisegu sisaldas 250 µg/ml insuliini, 1 mM DTT-d, 300 µM ATP-d, 0,2 µCi/µl [γ -³²P]ATP-d, substraati ja/või Chk1 kinaasi ning lõppmahuni puhver A-d. Inimese Mcm2-7 (4ΔN) kompleksi kineerimiskatsetes oli substraadi kontsentratsioon 20 nM ja Chk1 kinaasi kontsentratsioon 80 nM, hiire kompleksi kineerimisel vastavalt 40 nM ja 400 nM. Mcm4 N-terminuste kineerimiskatsetes oli nii inimese kui hiire puhul substraadi kontsentratsioon 2,1 µM ning kinaasi kontsentratsioon 400 nM. Katsetes kasutatud inimese ja hiire Chk1 kinaasi ning trunkeerimata Mcm4 sisaldanud Mcm2-7 kompleksi puhastas S. Koit (avaldamata).

Kõik kinaasireaktsioonid segati kokku jääl. Seejärel inkubeeriti neid 30 °C juures 30 minutit, tõsteti jääle tagasi, lisati 2,4 µl Laemmli 6x SDS puhvrit ning keedeti 5 min temperatuuril 100 °C. Reaktsioonisegu laeti 8% (Mcm2-7) või 12% (Mcm4N-term) polüakrüülamiidgeelile ning lahutati SDS-PAGE geelelektroforeesil 1x SDS jooksupuhvris. Geelid värviti hõbeda meetodil (Mcm2-7) või *Coomassie*'ga (Mcm4N-term), kuivatati Scie-Plas (Suurbritannia) geelikuivatiga GD4534 ühe tunni jooksul (~ 90 °C) ning radioaktiivne signaal jäädvustati CP-BU *new* röntgenfilmile (AGFA Healthcare, Belgia).

2.2.11 Polüakrüülamiidgeelide ja PVDF membraanide värvimiseks kasutatud tehnikad

2.2.11.1 *Coomassie Brilliant Blue*

Polüakrüülamiidgeele värviti Thermo Scientificu valguvärvimislahusega *PageBlue*, mis põhineb *Coomassie Brilliant Blue* G-250 värvil. Geele loputati 3 x 10 min *Milli-Q* vees, lisati *PageBlue* lahus nii, et geel oleks kaetud ning värviti poolteist kuni kaks tundi. Värvitud geele pesti 3 x 10 min või 6 x 5 min destilleeritud veega ning hoiti seejärel 5 min kuivatuslahuses (20% etanool, 10% glütserool). Geelid kuivatati raamis tsellofaani vahel.

2.2.11.2 Valkude värvimine hõbeda meetodil

Polüakrüülamiidgeelide hõbedaga värvimiseks fikseeriti geel 15 min jooksul 50% ning pesti seejärel 10 min 5% metanoolis. Fikseeritud geeli hoiti 10 min 32 µM DTT lahuses, et võimalikud saastavad oksüdeerijad redutseerida. Seejärel geel loputati kiirelt veega ning asetati 10 minutiks 1 mg/ml AgNO₃ lahusesse. Hõbedaga töödeldud geel loputati kiirelt kolm korda veega ning sellele lisati esmalt vähe ja seejärel ülejäänud ilmutuslahus (30 mg/ml

Na₂CO₃, 0,5 µl/ml formaldehüüdi). Kui bändid olid saavutanud soovitud intensiivsuse, peatati reaktsioon sidrunhappega. Hõbedaga värvitud geelid kuivatati raamis tsellofaani vahel. Kõikide lahuste valmistamiseks ja kõikideks pesudeks kasutati destilleeritud vett, lahuseid lisati geeli kohta 250 ml.

2.2.11.3 Colloidal Gold Total Protein Stain

PVDF (polüvinülideendifluoriid) membraani värvimiseks kolloidse kullaga pesti membraani 20 min 0,5% NP-40 (Sigma-Aldrich) lahuses ning loputati seejärel viis korda destilleeritud veega. Lisati *Colloidal Gold Total Protein Stain* valguvärvimislahus (Bio-Rad) ja oodati bändide ilmumiseni. Soovitud intensiivsuse saavutamisel värvimislahus eemaldati ning membraani pesti paar korda destilleeritud veega. PVDF membraan kuivatati raamis tsellofaani vahel.

2.2.12 Western blot

Western blot’iga analüüsiti transfekteeeritud ja P1 viirusvaruga nakatatud Sf9 rakkude lüsaate ning kontrolliti Mcm4ΔN subühiku olemasolu Mcm2-7 (4ΔN) kompleksides. Valgud lahutati SDS-PAGE geelelektroforeesil 12% (putukarakkude lüsaadid) või 8% (Mcm2-7 komplekside kontsentreerimine) polüakrüülamiidgeelis. Transfekteeeritud rakkude lüsaadi analüüsil laeti geelile 3 x 10³ rakule vastav kogus lüsaati ning P1 viirusvaruga nakatatud rakkude lüsaadi analüüsil vastavalt 1,3 x 10⁴ rakule vastav kogus. Mcm2-7 (4ΔN) komplekside kontsentreerimisel laeti geelile 12 µl (kontsentratsioon määramata) Superdex™ 200 kolonnist kogutud fraktsiooni 4, 1,2 pmol täispika Mcm4-ga Mcm2-7 kompleksi (puhastanud S. Koit, avaldamata) ning 0,2 pmol kontsentreeritud kompleksiga proovi.

SDS-PAGE geelelektroforeesil lahutatud valgud kanti metanoolis niisutatud ja kahelt poolt kolmekordse kihi Whatmani paberitega ümbritsetud PVDF membraanile Bio-Radi Trans-Blot® SD *Semi-Dry* ülekandemasinaga (45 min, 12 V). Ülekanne toimus *semi-dry* puhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool). Blokeerimiseks inkubeeriti membraani 1 tunni jooksul 5% lõssilahuses, misjärel lisati 2% lõssilahuses primaarne antikeha. Nii inimese kui hiire valkude Mcm4ΔN ja Mcm4N-term ning trunkeeritud või trunkeerimata Mcm4 sisaldanud Mcm2-7 kompleksi puhul kasutati 1:500 lahjendusega anti-Mcm4 antikeha (*rabbit polyclonal*, Santa Cruz Biotechnology). Mõlema organismi valgu Gins2ΔC puhul kasutati 1:1000 lahjendusega anti-Psf2 antikeha (*rabbit polyclonal*, Santa Cruz

Biotechnology). Primaarse antikehaga membraani inkubeeriti toatemperatuuril üks tund või 4 °C juures üleöö. Seejärel pesti membraani kolm korda 10 min *western blot*'i pesulahusega (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% *Tween*-20), pärast mida lisati 2% lõssilahuses 1:5000 lahjendusega sekundaarne HRP-ga (ingl *horseradish peroxidase*, määratõika peroksidaas) konjugeeritud *goat anti-rabbit* antikeha (LabAs, Eesti) ning membraani inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Seejärel pesti membraani uuesti kolm korda 10 min *western blot*'i pesulahusega. Signaali ilmutamiseks kasutati Amersham™ ECL™ *western blot*'i detektsioonireagente (GE Healthcare) ning signaal jäädvustati CP-BU *new* röntgenfilmile. Kõikide lõssilahuste valmistamiseks kasutati *western blot*'i pesulahust.

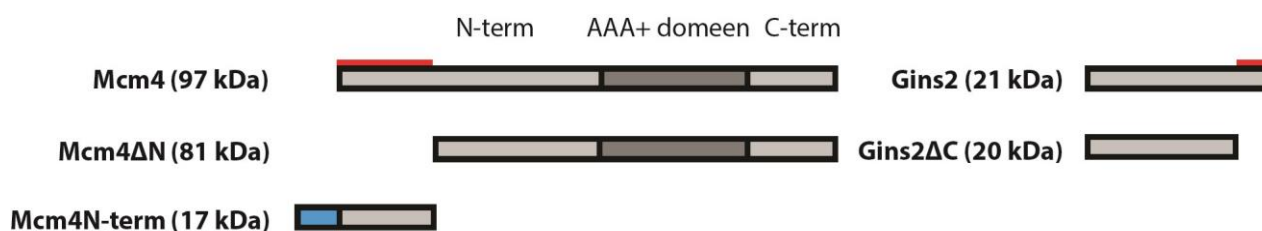
2.3 Tulemused ja arutelu

Ilves *et al.* (2012) on näidanud, et hariliku äädikakärbse rakutsükli kontrollkinaas Chk2 inhibeerib replikatiivset CMG helikaasi antud kompleksi kuuluvate valkude Mcm3, Mcm4 ning Psf2 fosforüleerimise kaudu, kusjuures Mcm4 puhul asuvad fosforüleerimise sihtmärgid 141 aminohappejäägi pikkuses N-terminaalses, Psf2 puhul aga 33 aminohappejäägi pikkuses C-terminaalses otsas. Samas töös viidi läbi erinevate hulkraksete antud piirkondade omavaheline joondamine, mis näitas muidu kõikides eukarüootides tugevalt homoloogsete Mcm ja Gins valkude kohta suhteliselt vähest konserveeritust (Lisa 1). Seejuures leiti aga kõikide organismide antud regioonidest mitmeid potentsiaalseid *checkpoint*-kinaaside märklaudadeks olevaid seriini- ja treoniinijääke. Kui valgu funktsiooni regulatsiooni olulisim komponent on laengute lisamine, mitte spetsiifiline struktuurielement, on just sellised vähekonserveerunud alad tihti regulatiivsete kinaaside sihtmärkideks (Holt *et al.*, 2009). Seepärast võib arvata, et äädikakärbses nähtud CMG helikaasi reguleerimine võib toimuda sarnaselt ka teistes organismides.

Käesoleva töö planeerimisel oligi aluseks hüpotees, et harilikus äädikakärbses kirjeldatud Mcm4 N-terminaalse ja Psf2 C-terminaalse piirkonna fosforüleerimine ei piirdu üksnes antud organismiga, vaid toimub analoogselt ka kõrgemates eukarüootides. Uuritavateks organismideks valiti eelpoolmainitud joondamisse kaasatud imetajate klassi esindajad inimene ja koduhiir. Kirjeldatud hüpoteesile tuginedes sooviti käesoleva töö raames luua tööriistad, mis hõlbustaksid inimese ja hiire antud valkude vastavates piirkondades *checkpoint*-kinaaside arvatavate sihtmärkaminoahappejääkide kaardistamist. Selleks valmistati bakuloviirustel põhinevad ekspressioonivektorid, mille abil ekspresseeritavad rekombinantid valgud võimaldaksid kinaaside potentsiaalsed sihtmärgid antud piirkondadesse lokaliseerida.

Lokaliseerimine saavutatakse eeldatavate sihtmärkpiirkondade deleteerimise kaudu, kui trunkeerimata valgud puhul nähtav fosforüleerimissignaali trunkeeritud valgud kaob.

Kuna Ilves *et al.* (2012) olid äädikakärbses analoogselt trunkeerimise juba teinud, kasutati nii inimese kui hiire Mcm4 ja Gins2 (alternatiivne nimi Psf2-le kõrgemates taksonites) puhul deletsioonipiiri leidmiseks eelpoolmainitud joendamist: mõlema organismi vastavates valkudes leiti äädikakärbses Mcm4 N-terminaalse ja Psf2 C-terminaalse piirkonnaga homoloogsed alad, mis deleteeriti. Trunkeeringutega eemaldati inimese Mcm4 puhul esimesed 152 ja Gins2 puhul viimased 15 aminohappejääki (valkude nimed vastavalt HsMcm4 Δ N ja HsGins2 Δ C) ning hiire Mcm4 ja Gins2 puhul vastavalt 151 ja 15 aminohappejääki (valkude nimed vastavalt MmMcm4 Δ N ja MmGins2 Δ C) (Joonis 7). Deletsiooniga sooviti nii Mcm4-s kui Gins2-s eemaldada just eelpoolkirjeldatud struktureerimata/vähestruktureeritud potentsiaalset regulatiivset funktsiooni omav piirkond, kusjuures oli teada, et analoogsed trunkeeringud ei mõjutanud äädikakärbses CMG kompleksi moodustumist ega selle aktiivsust (Ilves *et al.*, 2012). Lisaks konstrueeriti nii inimese kui hiire puhul oletatav kinaasi substraadiks olev Mcm4 N-terminaalne regioon ka iseseisva valguna (Joonis 7), et täiendavalt kontrollida piirkonna võimalikku fosforüleerimist (valkude nimed vastavalt HsMcm4N-term ja MmMcm4N-term). Valkude hilisema puhastamise hõlbustamiseks lisati mõlemale FLAG-afiinsusjärjestus. Kuna ülejäänud valgud plaaniti puhastada neile vastavate komplekside (Mcm2-7 või GINS) koosseisus, kus kindlale subühikule oli afiinsusjärjestus juba eelnevalt liidetud, ei olnud ülejäänud valkude puhul afiinsusmärgise lisamine vajalik.

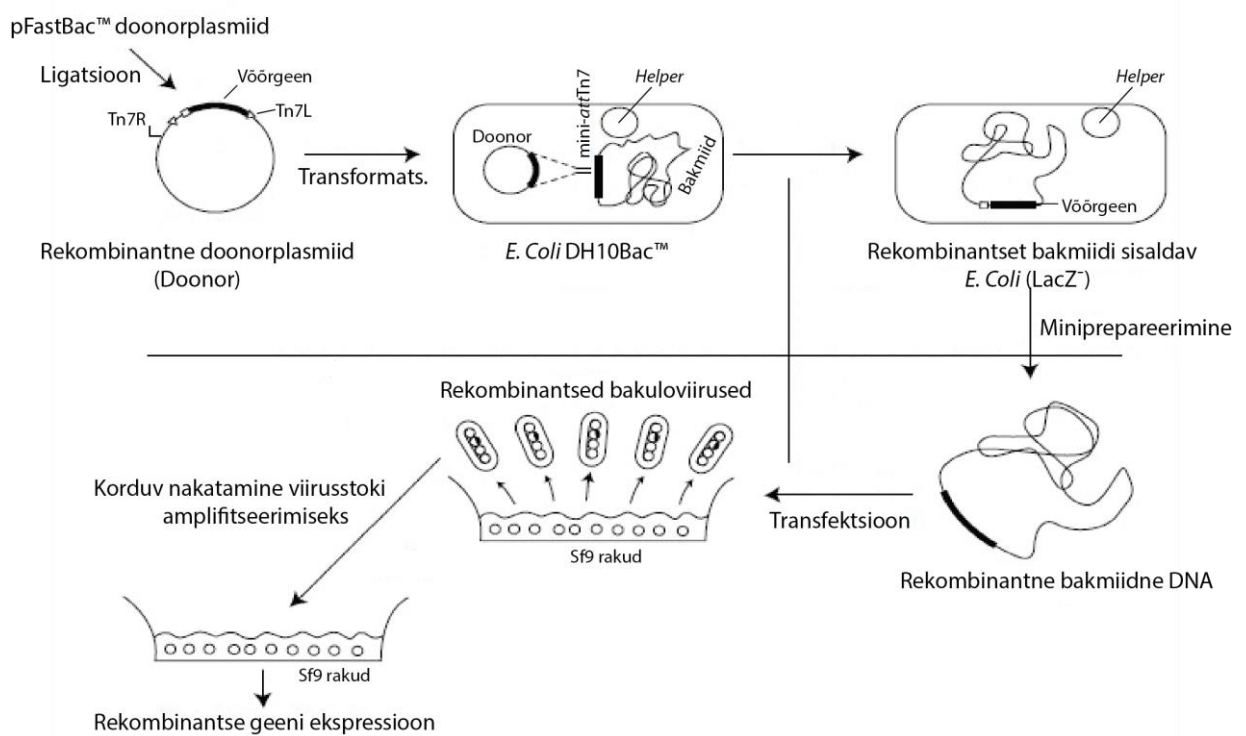


Joonis 7. Käesolevas töös konstrueerida plaanitud valgud. Joonisel on skemaatilisel näidatud täispikad Mcm4 ja Gins2 ning võrdlusena neile vastavad trunkeeritud valgud ja iseseisev Mcm4 N-terminus. Kõikide valkude puhul on sulgudes näidatud nende ennustuslikud suurused. Deleteeritud piirkonnad on näidatud punasega, FLAG-afiinsusjärjestus sinisega. Joonis koostatud Ilves *et al.* (2010) põhjal.

2.3.1 Bac-to-Bac[®] bakuloviiruse ekspressioonisüsteem

Rekombinantsete valkude ekspresseerimiseks kasutati firma Invitrogen välja töötatud Bac-to-

Bac[®] bakuloviirusepõhist ekspressioonisüsteemi. Tegemist on kiire ja efektiivse meetodiga, mis kasutab bakmiidset ülekandektorit ja kohtspetsiifilist rekombinatsiooni, et luua rekombinantseid võõrvalke ekspresseerivaid bakuloviiruseid. Antud süsteemi töötavust tõestavad muuhulgas selle abil puhastatud aktiivsed hariliku äädikakärbse ja inimese CMG helikaasid (Ilves *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). Meetodit illustreeriv skeem on toodud järgneval joonisel:

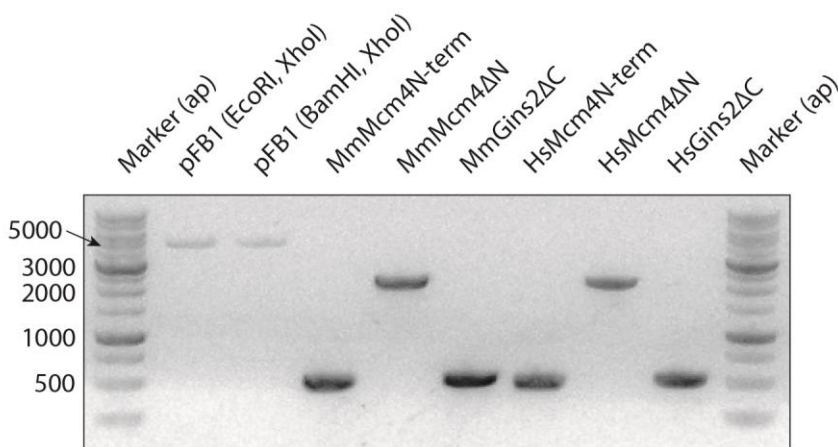


Joonis 8. Bac-to-Bac[®] ekspressioonisüsteemi ülevaatlik skeem. Konstrukt kloneeritakse pFastBac[™] doonorplasmidi Tn7 transposooni õlgade vahele (Tn7R ja Tn7L). Rekombinantne vektor transformeeritakse seejärel *E. coli* tüvesse DH10Bac[™], mis sisaldab Tn7 sihtmärkjärjestusega (mini-attTn7) bakmiidset DNA-d (bakmiidi). Transpositsiooniks vajalikku transposaasi kodeerib DH10Bac[™]-s asuv *helper*-plasmiid. Rekombineerunud bakmiidi sisaldavate kolooniate diferentseerimiseks kasutatakse LacZ-põhist sini-valge selektsiooni. Bakmiid miniprepareeritakse ning sellega transfekteeeritakse järgnevalt putukarakke. Putukarakkudes toodetud bakuloviirus kogutakse ja amplifitseeritakse nõutava tiitrini, misjärel nakatatakse putukarakke ekspressiooniks. Joonis mugandatud Bac-to-Bac[®] bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi manuaalis toodud skeemi põhjal (Invitrogen).

2.3.2 Rekombinantsete bakuloviiruste valmistamine

2.3.2.1 Rekombinantseid valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste klonereimine pFastBac1TM vektorisse

Rekombinantseid valke HsMcm4ΔN, HsGins2ΔC, HsMcm4N-term, MmMcm4ΔN, MmGins2ΔC ja MmMcm4N-term kodeerivate nukleotiidsete järjestuste valmistamiseks amplifitseeriti vastavad järjestused matriits-DNA-lt polümeraasi ahelreaktsiooni abil (kasutatud praimerid on toodud tabelis 1). Reaktsioonil saadud fragmendid restrikteeriti (Joonis 9) ning ligeeriti eelnevalt lõigatud pFastBacTM 1 vektorisse.



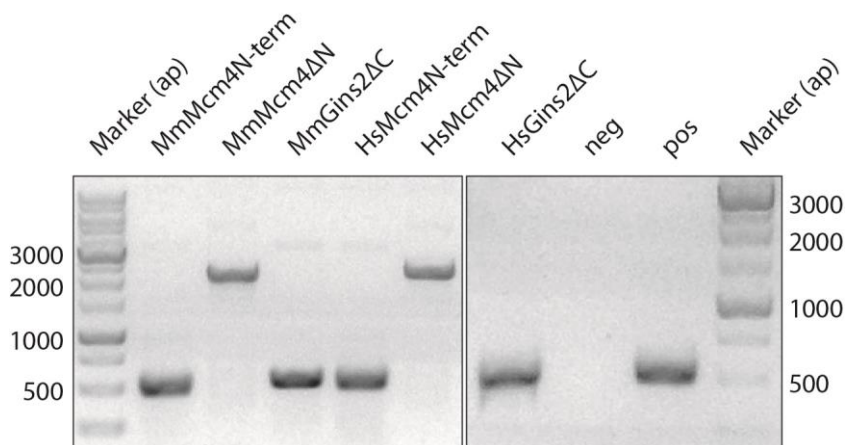
Joonis 9. Restrikteeritud pFastBacTM 1 vektorid ja PCR-i abil amplifitseeritud fragmendid. Fragmentide eeldatavad pikkused ja kasutatud restriктаasid on toodud tabelis 1. Restriктаasidega EcoRI ja XhoI lõigatud pFastBacTM 1 vektori (pFB1) eeldatav pikkus on 4711 aluspaari (ap), BamHI ja XhoI-ga lõigatud vektoril 4689 ap-d. Mm – *Mus musculus*, Hs – *Homo sapiens*.

Rekombinantsete konstruktid transformeeriti seejärel amplifitseerimiseks *E. coli* tüvesse DH5α, kust need miniprepereeriti. Protsessi tulemusel saadi kuus rekombinantset plasmidi (Tabel 1). Veendumaks, et valmistatud konstruktid on korrektsed, kontrolliti neid esmalt restriksioonanalüüsiga, misjärel õige tulemuse andnud plasmiidid sekveneeriti. Sekveneerimine kinnitas kõikide konstrueeritud rekombinantsete plasmiidide korrektsust.

2.3.2.2 Rekombinantseid valke kodeerivaid nukleotiidseid järjestusi sisaldavate bakmiidsete DNA-de valmistamine

Rekombinantsete plasmiidid transformeeriti järgnevalt *E. coli* tüvesse DH10BacTM, mis sisaldab bakmiidse ülekandektorina toimivat bakuloviirusgenoomi (bakmiidi). Antud tüves

toimus ekspressioonikasseti rekombinatsiooniline insertioon bakmiidi, misjärel eraldati rekombineerunud bakmiidsed DNA-d miniprepareerimise teel. Veendumaks, et puhastatud bakmiidid sisaldavad tõepoolest soovitud valke kodeerivaid nukleotiidseid järjestusi, amplifitseeriti neilt PCR-i abil kloneerimispraimeritega vastavad järjestused (Joonis 10). Kuna kõik reaktsioonid andsid produktiks õige suurusega fragmendi, olid valmistatud rekombinantsed bakmiidid korrektsed.



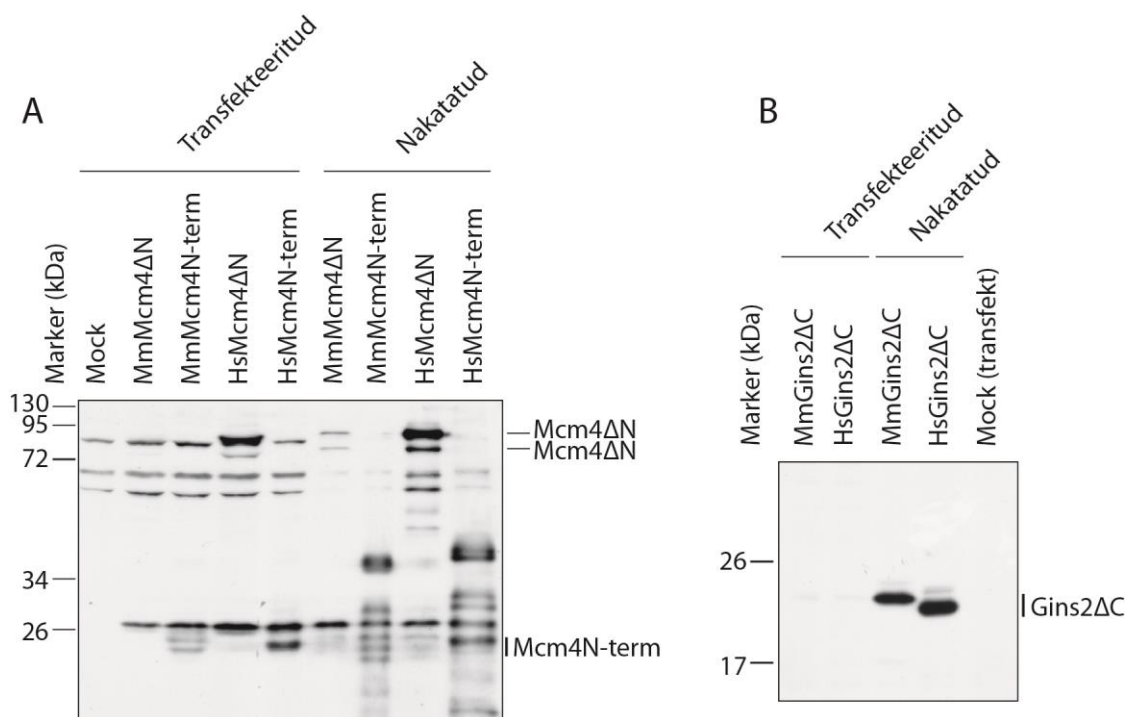
Joonis 10. Rekombinantsete bakmiidide kontroll PCR-iga. Kõik reaktsioonid viidi läbi kloneerimispraimeritega, fragmentide eeldatavad pikkused on toodud tabelis 1. Negatiivse kontrolli (neg) puhul ei lisatud reaktsioonisegule HsGins2ΔC järjestust sisaldavat bakmiidset DNA-d. Positiivse kontrollina (pos) kasutati HsGins2ΔC järjestust sisaldavat pFastBacTM1 konstrukti.

2.3.2.3 Sf9 rakkude transfektsioon, bakuloviiruse paljundamine ja rekombinantsete valkude ekspressiooni kontrollimine

Rekombinantsete bakuloviiruste saamiseks transfekteeriti puhastatud rekombinantsete bakmiididega *Spodoptera frugiperda* rakuliini Sf9. Esmase viirusvaru kogumisele (viiruse esimene põlvkond ehk P1 viirusvaru) järgnes selle paljundamine kahes korduses (teine ja kolmas põlvkond, vastavalt P2 ja P3 viirusvaru), et suurendada viiruse tiiter efektiivseks valguekspressiooniks vajalikule tasemele.

Selleks, et kontrollida, kas soovitud valgud olid bakuloviirustega nakatatud rakkudes ekspresseeritud, analüüsiti transfekteeritud ning P1 viirusvaruga nakatatud Sf9 rakkude lüsaate *western blot* meetodil (Joonis 11A, B). Nii inimese kui hiire Gins2ΔC valkude ekspressiooni transfekteeritud putkarakkudes ei detekteeritud (Joonis 11B). P1 viirusvaruga nakatatud rakkudes olid antud valgud siiski ekspresseeritud, mis näitab ilmekalt viirusvaru amplifitseerimise vajadust. Lisaks ilmnes käesoleval analüüsil, et inimese ja hiire Gins2ΔC valkude liikuvus oli pisut erinev, ehkki nende aminohappejääkide arv on identne ning

ennustuslik suurus (20 kDa) ühesugune. Võib arvata, et erinev liikumiskiirus tulenes valkude aminohappelise järjestuse eripäradest – ehkki tegemist on tugevalt homoloogsete valkudega, on nende aminohappeline koostis siiski mõnevõrra erinev (kattuvus 92,4%). Seetõttu võisid teatud spetsiifilised aminohappelised iseärasused põhjustada valkude erinevat polüakrüülamiidmaatriksiga interakteerumist.



Joonis 11. Rekombinantsete valkude ekspressiooni analüüs transfecteeritud ning P1 viirusvaruga nakatatud Sf9 rakkudes. (A) Inimese ja hiire valke Mcm4ΔN ja Mcm4N-term ekspresseerivate putukarakkude lüsaatidele tehtud *western blot*. Transfecteeritud rakkude puhul on radadele laetud 3×10^3 rakule vastav kogus lüsaati, P1 viirusvaruga nakatatud rakkude puhul vastavalt $1,3 \times 10^4$ rakule vastav kogus. Nii inimese kui hiire Mcm4ΔN valgu ennustuslik suurus on 81 kDa ning Mcm4 N-terminustel 17 kDa, kuid valkudele vastavad kaksikbändid liiguvad kõikidel geelidel ligikaudu 23 ja 25 kDa suurusele markerile vastavas piirkonnas. „Mock“ rajale on laetud nakatamata rakkude lüsaat. (B) Inimese ja hiire valku Gins2ΔC ekspresseerivatele putukarakkudele tehtud *western blot*. Nii transfecteeritud kui P1 viirusvaruga nakatatud rakkude puhul on radadele laetud eelpoolkirjeldatuga sama kogus lüsaati. Nii inimese kui hiire puhul on Gins2ΔC ennustuslik suurus 20 kDa.

Nii hiire kui inimese Mcm4ΔN valgud eraldati hilisema puhastamise käigus Sf9 rakkude ekstraktist kaksikbändidena (vt täpsemalt ptk 2.3.3) ning antud valgud olid mõlema organismi puhul P1 viirusvaruga nakatatud putukarakkudes ka selgelt nähtavad (Joonis 11A). Valkude ekspressioonitase oli seejuures inimese ja hiire puhul aga erinev: kui inimese valgud olid ekspresseeritud kõrgel tasemel, siis hiire vastavate valkude ekspressioonitase oli tunduvalt madalam. Suurima tõenäosusega oli selle põhjuseks antud konstrukti madalam transfectiooni efektiivsus võrreldes inimese konstruktiga, mistõttu oli madalamaks jäänud ka P1 viirusvaru

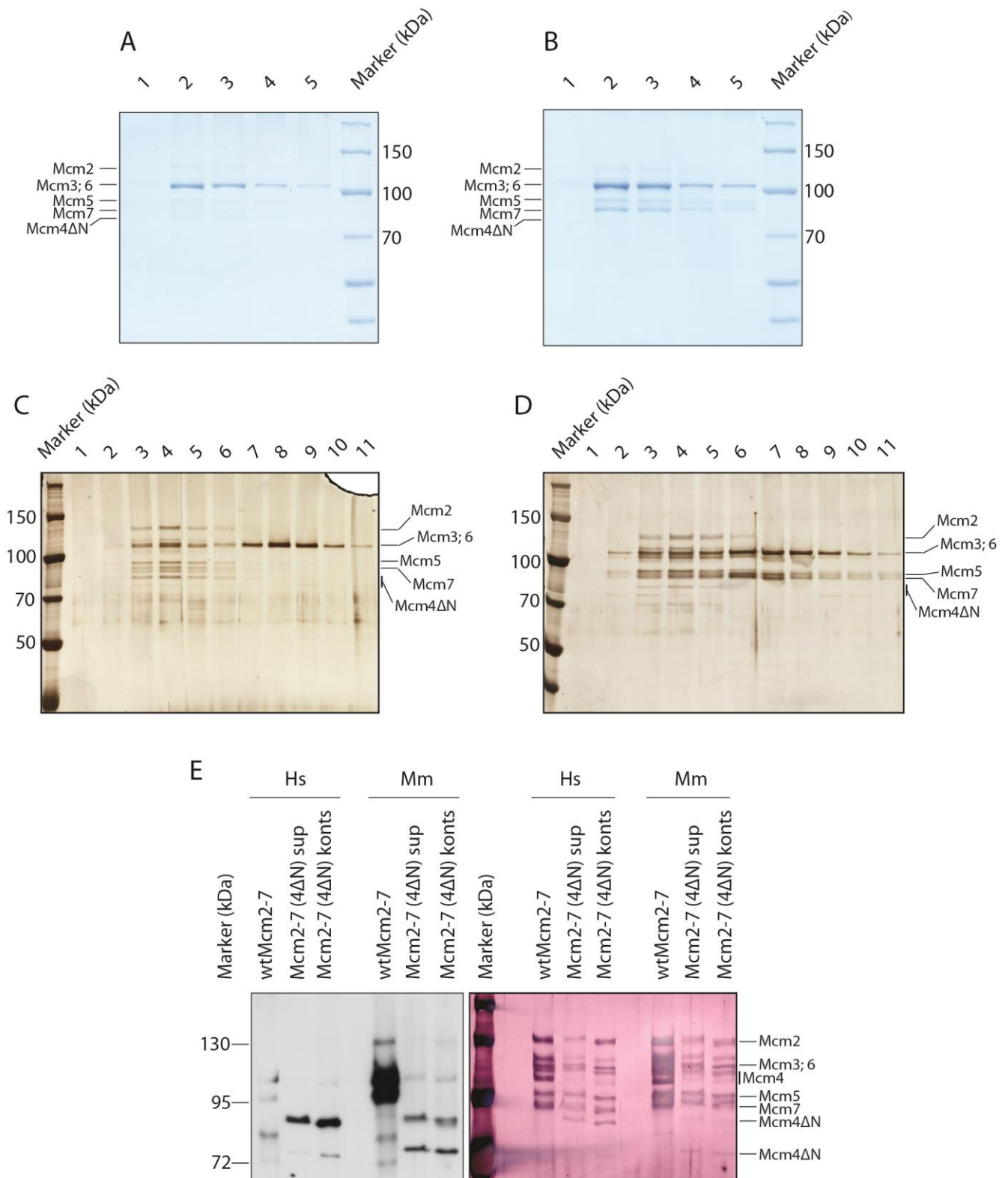
tiiter.

Nii hiire kui inimese Mcm4 N-terminuste puhul oli kasutatud Mcm4-vastase antikeha tugeva mittespetsiifilise seondumise tõttu korrektseid bände keeruline identifitseerida (Joonis 11A). Vastavatel radadel olid siiski nähtavad topeltbändid, mis olid võrreldavad valkude hilisemal puhastamisel saadud 23 ja 25 kDa suurusele markerile vastavate kaksikbändidega. Lisaks puudus antud signaal nii *mock* kui teiste konstruktide radadelt. Seetõttu olid mõlemad valgud putukarakkudes arvatavasti ikkagi ekspresseeritud.

2.3.3 Mcm2-7 (4ΔN) komplekside puhastamine

Samal ajal kui käesoleva bakalaureusetöö raames rekombinantseid bakuloviiruseid konstrueeriti, näitasid teiste laborikaaslaste saadud tulemused, et inimese ja hiire *checkpoint*-kinaasid Chk1 ja Chk2 antud organismide Gins2 valku ei fosforüleeri. Seetõttu puudus vajadus Gins2ΔC subühikuid sisaldavate GINS komplekside puhastamisega edasi minna ning järgnevaid puhastamisetappe ja *in vitro* kinaasikatseid jätkati vaid Mcm2-7 (4ΔN) komplekside ja Mcm4 N-terminustega.

Nii inimese kui hiire Mcm4ΔN valgud ekspresseeriti puhastamiseks terviklike Mcm2-7 komplekside koosseisus, milleks nakatati putukarakke samaaegselt valke Mcm2, FLAG-Mcm3, Mcm4ΔN, Mcm5, Mcm6 ja Mcm7 ekspresseerivate bakuloviirustega. Mcm2-7 (4ΔN) kompleksid eraldati Sf9 rakkude ekstraktist Mcm3 subühiku küljes olnud FLAG-afiinsusjärjestuse abil. Afiinsuskromatograafiakolonnist elueeritud proovide analüüs näitas, et mõlema organismi puhul eraldati rakulüsaadist tõepoolest Mcm2-7 (4ΔN) kompleks (Joonis 12A, B). Protsessi käigus oli aga lisaks tervikkompleksile rakuekstraktist puhastatud ka erinevaid osakomplekse, kuna subühikuid oli stöhhiomeetriliselt selgelt erinevas koguses. Suures ülehulgas oli esmajärjekorras Mcm3, mille küljes asuv afiinsusjärjestus kolonni maatriksile seoti. Samuti on teada, et Mcm valgud võivad esineda ebatäielike kompleksidena, teiste hulgas näiteks Mcm3/5 (Lee ja Hurwitz, 2001). Mcm2-7 (4ΔN) tervikkompleksi puhastamiseks ebatäielikest subkompleksidest ning vabast Mcm3-st kromatografeeriti FLAG-afiinsuskromatograafiakolonnist elueeritud fraktsioonid 2 ja 3 SuperdexTM 200 geelfiltratsioonikolonnist, mis eraldab valgud suuruse alusel. Kolonnist kogutud alikvootide 1-11 analüüs näitas, et inimese puhul sisaldasid fraktsioonid 3/4/5/6 ning hiire puhul 3/4/5 stöhhiomeetrilisi Mcm2-7 (4ΔN) tervikkomplekse (vastavalt joonised 12C ja 12D).



Joonis 12. Inimese ja hiire Mcm2-7 (4ΔN) kompleksi puhastamine rekombinantsete bakuloviirustega nakatatud Sf9 rakkudest. Sf9 rakke nakatati inimese (A) ja hiire (B) Mcm2-7 (4ΔN) kompleksi subühikuid ekspresseerivate viirustega ning vastavad kompleksid puhastati Mcm3 valgu küljes asunud FLAG-afiinsusjärjestuse abil. FLAG-afiinsuskromatograafiakolonnist elueeritud fraktsioone 1-5 analüüsiti SDS-PAGE geelelektroforeesil, kasutades valkude visualiseerimiseks Coomassie valguvärvimislahust. (C) Inimese ja (D) hiire täispika stöhhiomeetrilise Mcm2-7 (4ΔN) kompleksi täiendav puhastamine Superdex™ 200 geelfiltratsioonikolonnist. Joonisel on hõbedaga värvimise meetodil analüüsitud kolonnist kogutud alikvoote 1-

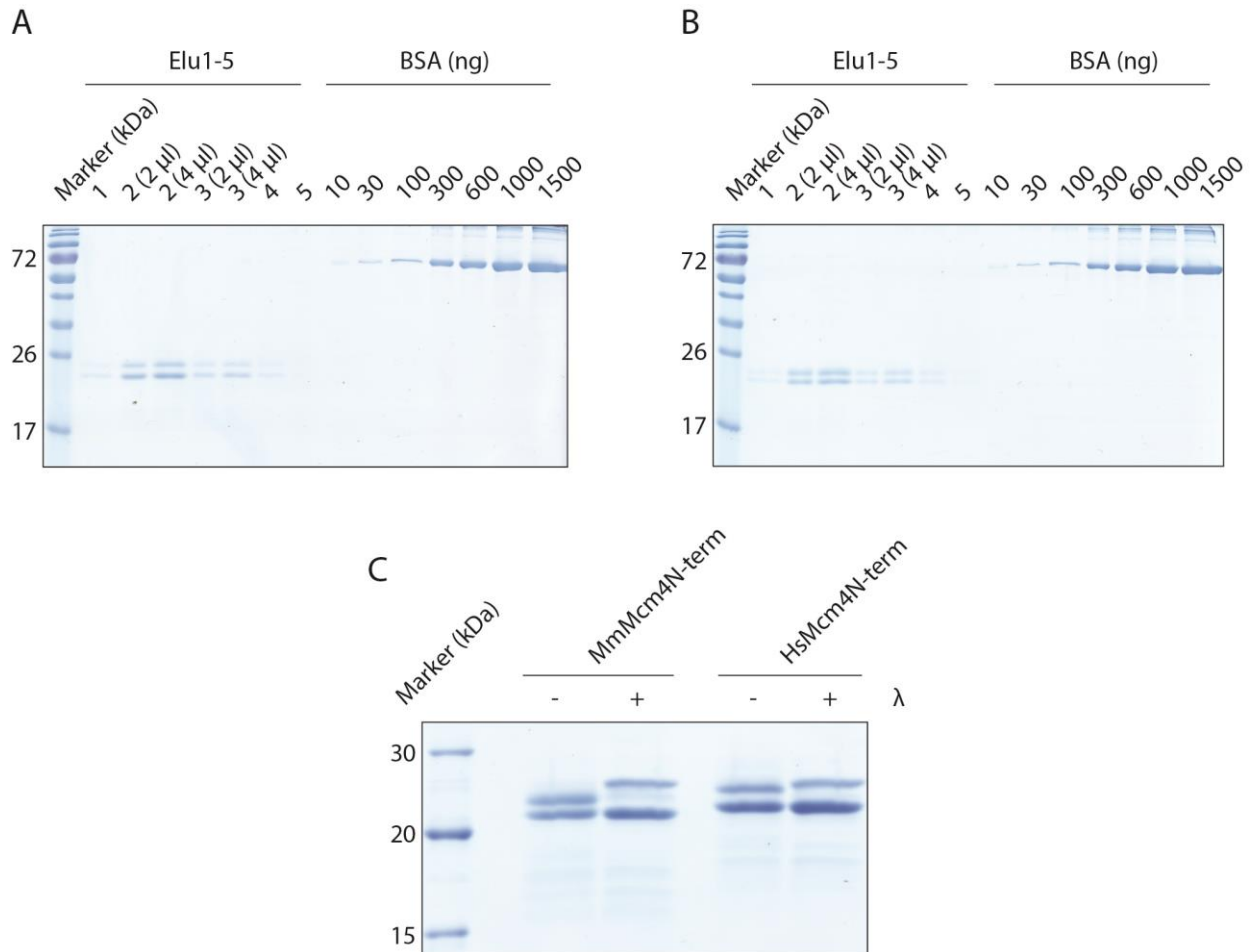
11. (E) Inimese ja hiire Mcm4 Δ N valgu olemasolu kontrollimine Mcm2-7 (4 Δ N) kompleksides. Joonisel on näidatud Mcm2-7 (4 Δ N) komplekside *western-blot* (vasakul) ja kullaga värvitud PVDF membraan (paremal), mis on paigutatud kohakuti ning on omavahel võrreldavad. Mõlema organismi puhul on radadele laetud ligikaudu 1,2 pmol täispika Mcm4-ga Mcm2-7 kompleksi (wtMcm2-7), seejärel 12 μ l Superdex™ 200 kolonnist kogutud fraktsiooni number 4 (Mcm2-7 (4 Δ N) sup, kontsentratsioon määramata) ning viimasena ligikaudu 0,2 pmol kontsentreeritud Mcm2-7 (4 Δ N) kompleksi (Mcm2-7 (4 Δ N) konts). Wt – ingl *wild type* (metsiktüüp).

Kuna Mcm2-7 (4 Δ N) kompleksid eraldati rakuekstraktist võrdlemisi madalas kontsentratsioonis (Joonis 12A, B) ning geelfiltratsioonis lahjenes valguproov veelgi, ei olnud lõpliku puhastatud kompleksi kontsentratsioon kinaasikatsete läbiviimiseks piisav, mistõttu proove kontsentreeriti. Kontsentreeritud Mcm2-7 (4 Δ N) komplekse analüüsiti seejärel *western blot* meetodil, et kontrollida neis kindlalt Mcm4 Δ N valgu olemasolu (Joonis 12E). Lisaks värviti *western blot*'i ülekandeks kasutatud PVDF membraan kulla meetodil, mis visualiseerib kõik membraanile ülekandunud valgud (Joonis 12E). Kontrollina kasutati täispika Mcm4-ga Mcm2-7 komplekse. *Western blot* analüüsil ilmnis, et mõlema organismi puhul oli valk Mcm4 Δ N Mcm2-7 kompleksidesse inkorporeeritud kahes vormis, mis olid tegelikkuses näha juba eelneval ekspressiooni analüüsil (vt ptk 2.3.2.3). Sarnaselt andsid Mcm4 subühikud kaksikbändi ka trunkeerimata Mcm4 sisaldanud Mcm2-7 komplekside puhul. Seetõttu võib arvata, et Mcm4 valku modifitseeritakse putukarakkudes C-terminaalselt (nt proteolüüsitakse ja/või fosforüleeritakse). Vaatamata Mcm4 Δ N valgu jagunemisele kahe vormi vahel, näitas antud *western blot* analüüs selgelt, et subühik oli tõepoolest nii inimese kui hiire Mcm2-7 (4 Δ N) kompleksis esindatud. Kui liita kokku valkude mõlemad vormid ning võrrelda nende ligikaudset summarset kontsentratsiooni teiste subühikutega kullaga värvitud membraanil, olid mõlemad kompleksid seejuures sisuliselt stöhhiomeetrilised. Nii inimese kui hiire Mcm2-7 (4 Δ N) kompleksid olid seega valmistatud õnnestunult. Juhul kui kiiremini liikunud Mcm4 Δ N bändide puhul oli tegemist tõepoolest degradatsiooniproduktidega, tuleks tulevikus antud komplekside puhastamisprotseduuri optimeerida, näiteks ekspresseerida valke kolme päeva asemel kaks päeva. Samuti võiks aidata *Trichoplusia ni* rakuliini High Five™ kasutamine, mis on probleemsete valkude ekspresseerimiseks sobivam süsteem.

2.3.4 Mcm4 N-terminuste puhastamine

Inimese ja hiire Mcm4 N-terminused ekspresseeriti puhastamiseks iseseisvalt ning eraldati Sf9 rakkude ekstraktist valkude külge liidetud FLAG-afiinsusjärjestuse kaudu. Mõlema organismi puhul puhastus valk kaksikbändina (Joonis 13A, B), mille põhjuseks oli

tõenäoliselt putukarakkudes toimunud modifitseerimine, arvatavasti kas fosforüleerimine või proteolüüs. Uurimaks, kas lisabändide teket põhjustas fosforüleeritud vorm, töödeldi valke λ -fosfataasiga (Joonis 13C). Töötluse tulemusel muutus ülemise bändi liikuvus mõlema organismi puhul, mis näitab, et ülemiste bändide puhul oli tõepoolest tegemist fosforüleeritud vormidega. Alumiste bändide liikuvus aga ei muutunud. Viimaste puhul võis seega tegu olla näiteks proteaaside lõigatud fragmentidega.



Joonis 13. Mcm4 N-terminuste puhastamine Sf9 rakkude ekstraktist ning valkude fosfataasitöötlus. Sf9 rakke nakatati hiire (A) ja inimese (B) Mcm4 N-terminust ekspresseerivate bakuloviirustega ning vastavad kompleksid puhastati valgu külge liidetud FLAG-afiinsusjärjestuse abil. FLAG-afiinsuskromatograafiakolonnist elueeritud fraktsioone 1-5 analüüsiti SDS-PAGE geelelektroforeesil, kasutades valkude visualiseerimiseks *Coomassie* valguvärvimislahust. Samu geele kasutati valkude kontsentratsiooni määramiseks, milleks võrreldi tundmatu kontsentratsiooniga Mcm4 N-terminuste signaalide intensiivsust teadaolevate BSA koguste intensiivsusega. Seetõttu on fraktsioone 2 ja 3 laetud kaks erinevat ruumala (teisi fraktsioone on laetud 4 μ l). (C) Mcm4 N-terminuste töötlus λ -fosfataasiga. Valkude visualiseerimiseks kasutati *Coomassie* valguvärvimislahust. (+) fosfataas lisatud, (-) fosfataas lisamata.

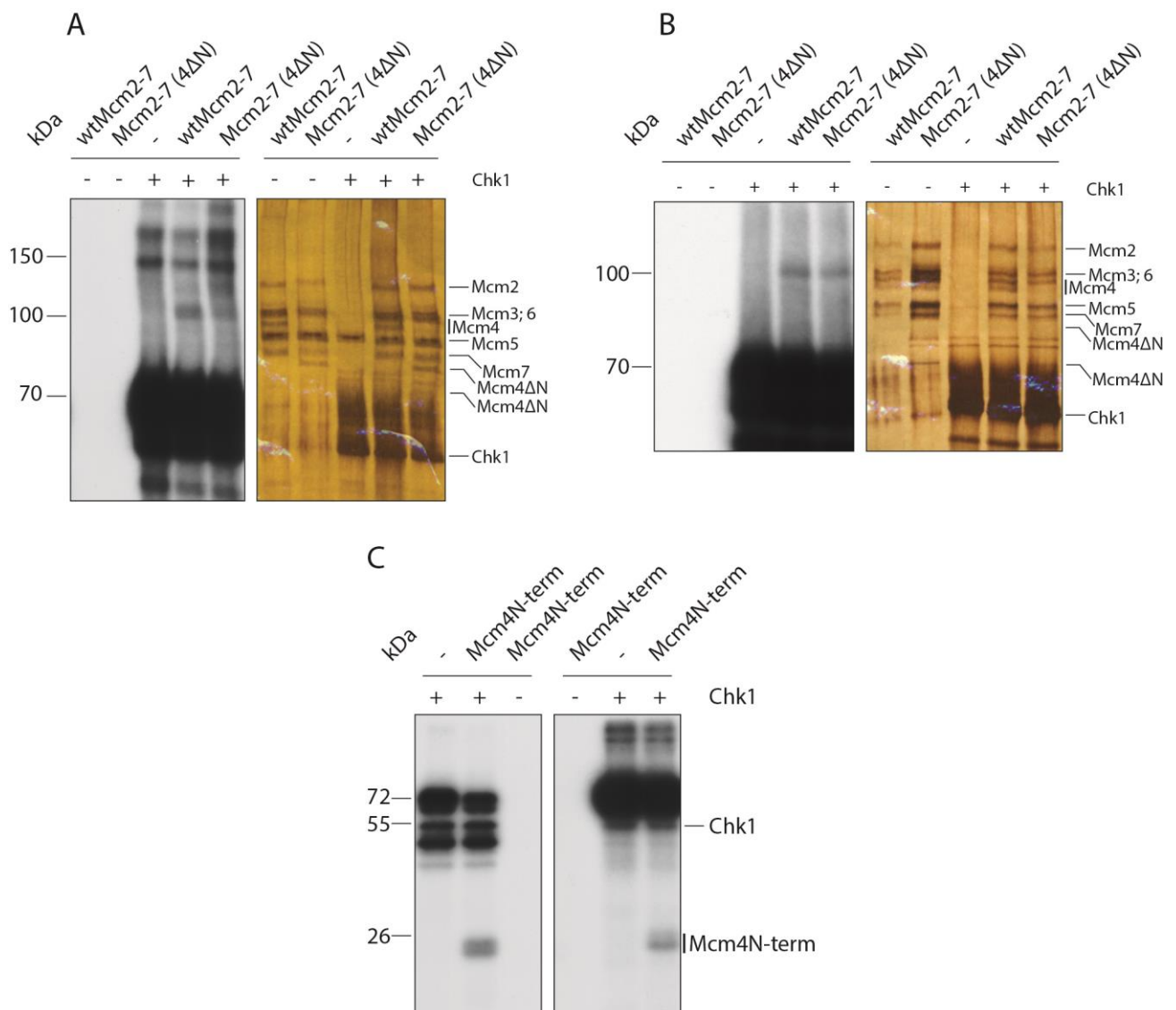
2.3.5 *In vitro* kinaasikatsed

Meie laboris tehtud kinaasikatsed inimese ja hiire täispikkade Mcm2-7 komplekside ning Chk1 ja Chk2 kinaasidega on näidanud, et mõlema organismi Chk1 kinaasi sihtmärkideks on Mcm4 ja Mcm3, samas kui Chk2 fosforüleerib üksnes Mcm3 ning vastav substraadiafiinsus on väga nõrk (Sandra Koit ja Ivar Ilves, avaldamata). Seetõttu valiti antud töös teostatud kinaasikatsetesse just Chk1.

Chk1 kinaasiga kineeriti esmalt inimese ja hiire trunkeeritud või täispikka Mcm4 sisaldavat Mcm2-7 kompleksi. Autoradiograafide kõrvutamisel hõbedaga värvitud geelidega andis mõlema organismi puhul signaali bänd, mis vastas koosjooksvatele Mcm3-le ja Mcm6-le (Joonis 14A, B). Arvatavasti fosforüleeriti siin just Mcm3, mida fosforüleeriti ka meie laboris teostatud varasemate kinaasikatsete käigus (S. Koit ja I. Ilves, avaldamata), ning lisaks on antud valk *checkpoint*-kinaaside sihtmärgiks ka harilikus äädikakärbses (Ilves *et al.*, 2012). Eelnevates kinaasikatsetes nähtud spetsiifilist Mcm4 fosforüleerimist ei olnud aga nii hiire kui inimese puhul käesolevas töös võimalik tuvastada (Joonis 14A, B). Selle põhjuseks oli arvatavasti reaktsioonimahust tulenevate limitatsioonide tõttu katsetes kasutatud substraadi ja kinaasi liialt madal kontsentratsioon (täpsemalt allpool). Iseseisvate Mcm4 N-terminuste kineerimisel nähti fosforüleerimissignaali mõlema organismi puhul (Joonis 14C). Autoradiograafidel olid näha ka tugevad 70 kDa markerist allpool jooksvad signaalid, mis olid tingitud kinaaside autofosforüleerimisest.

Mcm4 N-terminuste kineerimisel nähtud fosforüleerimissignaal kinnitas, et Chk1 on nii hiires kui inimeses Mcm4 N-terminaalset regiooni võimeline fosforüleerima. Tegemist on kahtlemata tulemusega, mis toetab tugevalt käesoleva töö hüpoteesi, kuid samas ei ole antud katse siiski piisav, et fosforüleerimist kindlalt antud regiooni lokaliseerida. Kuna trunkeerimata Mcm4 sisaldanud Mcm2-7 kompleksi puhul Mcm4 fosforüleerimist ei nähtud, ei olnud käesoleva töö raames vastavat lokaliseerimist ka teostada võimalik. On tõenäoline, et täispika Mcm4 subühiku puhul ei nähtud fosforüleerimissignaali kinaasireaktsioonides kasutatud madalate substraadi kontsentratsioonide tõttu. Nii inimese kui hiire Mcm2-7 (4ΔN) kompleksid puhastusid väga madalas kontsentratsioonis, mida vaatamata kontsentreerimisele ei suudetud märkimisväärselt tõsta. Samuti ei olnud limiteeritud aja tõttu käesoleva töö raames kahjuks võimalik komplekse uuesti puhastada. Reaktsioonimahust tulenevate piirangute tõttu sai seepärast kineerimiskatsetes inimese komplekside puhul kasutada vaid 20 nM ning hiire puhul 40 nM substraati, mis arvatavasti ei ole fosforüleerimissignaali

nägemiseks piisav. Kuna Mcm4 N-terminused puhastusid võrreldes Mcm2-7 (4ΔN) kompleksidega märkimisväärselt kõrgemas kontsentratsioonis, sai nende puhul ka kinaasikatsetes tõsta substraadi 2,1 μM-ni. Seejuures jäeti kinaasi kontsentratsioon samaks hiire Mcm2-7 komplekside kineerimiskatses kasutatuga. N-terminuste kineerimisel nähtud signaal toetab seetõttu kahtlusi, et Mcm2-7 kompleksidega tehtud kinaasikatsetes jäi substraadi kontsentratsioon liialt madalaks. Käesolevas töös kasutatud substraadi ja kinaasi kontsentratsioonide juures nähtud Mcm3 fosforüleerimine tulenes arvatavasti lihtsalt Chk1 kinaasi suuremast afiinsusest antud substraadi suhtes. Ka varasemates katsetes, kus on nähtud Mcm4 fosforüleerimist, on Mcm3-le vastav signaal olnud alati tugevam (S. Koit ja I. Ilves, avaldamata).



Joonis 14. Kinaasitestide autoradiograafid ja hõbedaga värvitud polüakrüülamiidgeelid. Kõiki kinaasireaktsioone inkubeeriti temperatuuril 30 °C 30 min, misjärel lisati 1x lõppkontsentratsioonini 6x Laemmli SDS puhvrit ning keedeti 100 °C juures 5 min. Valguproovid lahutati SDS-PAGE geelelektroforeesil 1x SDS jooksupuhvris. Geelid värviti hõbedaga meetodil (Mcm2-7 kompleksid) või *Coomassie* valguvärvimislahusega (Mcm4 N-terminused), kuivatati ühe tunni jooksul geelikuivatis (~ 90° C) ning radioaktiivne signaal jäädvustati

röntgenfilmile. (A) Inimese kinaasikatsete autoradiograaf (vasakul) ja hõbedaga värvitud polüakrüülamiidgeel (paremal). Autoradiograaf ja hõbedaga värvitud geel on paigutatud kohakuti ning on omavahel võrreldavad. Katsetes kasutati 20 nM substraati ning 80 nM kinaasi. (+) Chk1 lisatud, (-) Chk1 lisamata. (B) Hiire kinaasikatsete autoradiograaf (vasakul) ja hõbedageel (paremal). Kineerimisel kasutati 40 nM substraati ja 400 nM kinaasi. (C) Hiire (vasakul) ja inimese (paremal) Mcm4 N-terminuste kineerimise autoradiograafid. Katsetes kasutati 400 nM kinaasi ja 2,1 μ M substraati. Polüakrüülamiidgeel on näitamata, kuna *Coomassie*'ga värvitud geelil kaotasid bändid kuivatamisel värvi.

Teoreetiliselt võis erinevus Mcm2-7 kompleksis asuva täispika Mcm4 mittefosforüleerimise ja vaba Mcm4 N-terminuse fosforüleerimise vahel tuleneda ka fragmendi küljes olnud FLAG-afiinsusjärjestusest. Nimelt võib spetsiifiline afiinsusjärjestus teatud tingimustel luua kinaasile sobiva kinnitumispaiga, mis võimaldab sel fosforüleerida muidu kättesaamatuid aminohappejääke. Ehkki antud võimalus on vähetõenäoline, tuleks kahtluse välistamiseks katseid kas afiinsusjärjestuseta või mõne alternatiivse järjestusega varustatud valguga korrata.

Käesolevas töös konstrueeriti tulemuslikult rekombinantsed bakuloviirused, mis ekspresseerivad inimese ja hiire rekombinantseid valke Mcm4 Δ N, Mcm4N-term ja Gins2 Δ C. Need võimaldavad Mcm2-7 ja GINS komplekside subühikutes Mcm4 ja Gins2 *checkpoint*-kinaaside arvatavate sihtmärkpiirkondade lokaliseerimist ning hõlbustavad seeläbi hilisemat sihtmärkaminoahappejääkide massispektromeetrilist kaardistamist. Antud juhul puhastusid Mcm2-7 (4 Δ N) kompleksid siiski sedavõrd madalas kontsentratsioonis, et neid ei olnud võimalik loodetud eesmärgil kasutada. Seetõttu tuleks komplekside puhastamist tulevikus korrata. Nii inimese kui hiire Mcm4 N-terminused puhastusid aga kõrges kontsentratsioonis ning nendega tehtud kinaasikatsed kinnitavad, et Chk1 fosforüleerib antud piirkonda jäävaid aminohappejääke mõlemas organismis. See tulemus on kooskõlas varasemates kinaasikatsetes nähtuga ning on kogu kõrgemates eukarüootides toimuva võimaliku CMG inhibeerimise probleemi uurimise seisukohalt tugevalt toetavaks informatsiooniks. Ootele jääb käesoleval hetkel Gins2 Δ C valku ekspresseeriv bakuloviirus, kuna *checkpoint*-kinaasid seda nii inimeses kui hiires ei fosforüleeri. Vastav GINS (2 Δ C) kompleks võib rakendust leida siiski tulevikus, kui puhastatakse järgmised genotoksilise stressi vastuskinaasid.

KOKKUVÕTE

Genoomi replikatsioon on fundamentaalne protsess, mis on aluseks rakkude paljunemisele. Replikatsiooni viib läbi spetsiifiline masinavärk – replisoom –, mille liikumapanevaks jõuks on eukarüootides replikatsiooni initsiatsioonietapi käigus komplekteeritav replikatiivne CMG helikaas. Oma keskse rolli tõttu replisoomi funktsioneerimises on CMG helikaas ühtlasi oluline replikatsiooni reguleerivate kinaaside sihtmärk. Ilves *et al.* (2012) on näidanud, et hariliku äädikakärbse rakutsükli kontrollkinaas Chk2 inhibeerib CMG helikaasi antud kompleksi kuuluvate valkude Mcm3, Mcm4 ning Psf2 (Gins2) fosforüleerimise kaudu. Seejuures lokaliseeriti Mcm4 puhul kinaasi sihtmärkaminohappejäägid subühiku N-terminaalsesse ning Psf2 puhul vastavalt C-terminaalsesse piirkonda.

Käesoleva bakalaureusetöö lähtepunktiks oli huvi uurida, kas sarnane CMG helikaasi regulatsioon toimub ka kõrgemates eukarüootides, täpsemalt inimeses ja koduhiires. Töö eesmärgiks oli valmistada inimese ja hiire Mcm2-7 ja GINS komplekside subühikutel Mcm4 ja Gins2 põhinevad ekspressioonivektorid, mille abil ekspresseeritavad rekombinantsed valgud võimaldaksid S-faasi kontrollpunkti vastuskinaaside märklaudaminohappejääkide lokaliseerimist eelpoolmainitud piirkondadesse ning hõlbustaksid ja kiirendaksid sellega konkreetsete märklaudaminohappejääkide hilisemat massispektromeetrilist kaardistamist. Lisaks plaaniti mõlema organismi puhul puhastada valmistatud ekspressioonivektoreid kasutades Mcm4 subühikul põhinenud valgud, et analüüsida rakutsükli kontrollkinaas Chk1 sihtmärkaminohappejääkide paiknemist Mcm4 N-terminaalses piirkonnas.

Töö tulemusel konstrueeriti inimese ja hiire Mcm4 ja Gins2 valkude trunkeeritud vorme ning Mcm4 N-terminaalset piirkonda ekspresseerivad bakuloviirusvektorid. Seejuures näidati, et kõik soovitud valgud olid putukarakkudes ka edukalt ekspresseeritud. Seejärel puhastati mõlema organismi puhul iseseisev Mcm4 N-terminus ja deletsiooniga Mcm4 subühikut sisaldanud Mcm2-7 kompleks ning analüüsiti nende fosforüleerimist Chk1 kinaasi poolt. *In vitro* kinaasikatsed näitasid, et nii inimeses kui hiires on Chk1 tõepoolest võimeline iseseisvalt ekspresseeritud Mcm4 N-terminaalset piirkonda fosforüleerima. Lisaks nähti mõlema organismi puhul nii täispikka kui trunkeeritud Mcm4 sisaldanud Mcm2-7 kompleksis oodatult Mcm3 fosforüleerimist. Mcm4 fosforüleerimist nii inimese kui hiire täispikka Mcm4 sisaldanud Mcm2-7 kompleksis antud juhul aga ei nähtud, mille põhjuseks oli arvatavasti kasutatud valkude madal kontsentratsioon. Seega ei olnud käesoleva töö raames võimalik fosforüleerimist eksklusiivselt Mcm4 N-terminaalsesse regiooni lokaliseerida.

The Mcm4 and Gins2 subunits of the replicative CMG helicase as possible substrates of the checkpoint kinase Chk1

Märt Rannap

SUMMARY

In order to ensure viable offspring, cell division requires high fidelity replication of the entire genome. Central to achieving this feat is the replication machinery, or the replisome, which is assembled during the initiation stage of DNA replication. In eukaryotes, assembly of the replisome revolves around the formation of the replicative CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS) helicase and is divided into two distinct steps. During the first step two copies of the core of the CMG complex, the hexameric Mcm2-7 helicase, are loaded onto chromatin in an inactive form. These are then activated during the second step, when two activation factors, the protein Cdc45 and the GINS complex, interact with the hexamer, forming the replicative helicase. Together with the additional factors three DNA polymerases are also brought to the helicase, leading to the formation of the active replisome.

The CMG helicase is not just essential for regular replication, but also plays a crucial role during replication under conditions of genotoxic stress – a phenomenon which occurs when DNA becomes damaged by genotoxins. The primary means of dealing with genotoxic stress during replication is the active slowing of the S-phase, which provides the cell with additional time to eliminate any damage to DNA. This is achieved through kinases activated by the S-phase checkpoint, which have been shown to phosphorylate different subunits of the Mcm2-7 hexamer, as well as two initiation factors, inhibiting the formation of the active CMG helicase. Recent data by Ilves et al. (2012) suggests, however, that in *Drosophila melanogaster* also already active replisomes might be inhibited through the phosphorylation of the Mcm3 subunit, as well as the N-terminal tail of the Mcm4 and the C-terminal tail of the Gins2 subunits of the CMG helicase and that this phosphorylation might also be present in other metazoa.

Hypothesizing that the latter is true, the aim of this study was to construct recombinant baculoviral expression vectors expressing the modified human and mouse CMG subunits Mcm4 and Gins2, which would facilitate the mass spectrometrical identification of the exact

amino acid residues phosphorylated by different S-phase checkpoint response kinases in these two proteins. As a result of the study, six baculoviral expression vectors expressing the human and mouse truncated Mcm4 and Gins2 proteins and additionally the truncated N-terminal region of Mcm4 were created. It was verified that all of the baculoviral constructs successfully expressed the intended recombinant protein.

Both human and mouse Mcm2-7 complexes, containing the truncated Mcm4 subunit, and the individual N-terminal regions of Mcm4 were then purified to study their phosphorylation *in vitro* by the checkpoint kinase Chk1. It was demonstrated that Chk1 phosphorylates the N-terminal region of Mcm4 in both human and mouse. The Mcm2-7 complexes containing the truncated Mcm4 subunit purified, however, at such low concentrations, that they could not be used for localization of the phosphorylation signal. These complexes should therefore be purified again in the future with an emphasis on maximum yield of the process.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Bae, B., Chen, Y.-H., Costa, A., Onesti, S., Brunzelle, J.S., Lin, Y., Cann, I.K.O., and Nair, S.K. (2009). Insights into the Architecture of the Replicative Helicase from the Structure of an Archaeal MCM Homolog. *Structure* 17, 211–222.

Barry, E.R., McGeoch, A.T., Kelman, Z., and Bell, S.D. (2007). Archaeal MCM has separable processivity, substrate choice and helicase domains. *Nucleic Acids Res.* 35, 988–998.

Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). Dna Replication in Eukaryotic Cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 333–374.

Bochman, M.L., and Schwacha, A. (2009). The Mcm Complex: Unwinding the Mechanism of a Replicative Helicase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 652–683.

Boos, D., Frigola, J., and Diffley, J.F. (2012). Activation of the replicative DNA helicase: breaking up is hard to do. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 423–430.

Bowers, J.L., Randell, J.C.W., Chen, S., and Bell, S.P. (2004). ATP Hydrolysis by ORC Catalyzes Reiterative Mcm2-7 Assembly at a Defined Origin of Replication. *Mol. Cell* 16, 967–978.

Brewster, A.S., and Chen, X.S. (2010). Insights into the MCM functional mechanism: lessons learned from the archaeal MCM complex. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45, 243–256.

Brewster, A.S., Wang, G., Yu, X., Greenleaf, W.B., Carazo, J.M., Tjajadi, M., Klein, M.G., and Chen, X.S. (2008). Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: Functional insights for an AAA+ hexameric helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20191–20196.

Cannon, B., Kuhnlein, J., Yang, S.-H., Cheng, A., Schindler, D., Stark, J.M., Russell, R., and Paull, T.T. (2013). Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18868–18873.

Chang, Y.P., Wang, G., Bermudez, V., Hurwitz, J., and Chen, X.S. (2007). Crystal structure of the GINS complex and functional insights into its role in DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12685–12690.

Chibazakura, T., McGrew, S.G., Cooper, J.A., Yoshikawa, H., and Roberts, J.M. (2004). Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4465–4470.

Choi, J.M., Lim, H.S., Kim, J.J., Song, O.-K., and Cho, Y. (2007). Crystal structure of the human GINS complex. *Genes Dev.* 21, 1316–1321.

Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627.

Cortez, D., Glick, G., and Elledge, S.J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10078–10083.

- Costa, A., and Onesti, S. (2009). Structural biology of MCM helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 326–342.
- Costa, A., Ilves, I., Tamberg, N., Petojevic, T., Nogales, E., Botchan, M.R., and Berger, J.M. (2011). The structural basis for MCM2–7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 471–477.
- Costa, A., Renault, L., Swuec, P., Petojevic, T., Pesavento, J.J., Ilves, I., MacLellan-Gibson, K., Fleck, R.A., Botchan, M.R., and Berger, J.M. (2014). DNA binding polarity, dimerization, and ATPase ring remodeling in the CMG helicase of the eukaryotic replisome. *eLife* 3, e03273.
- Coster, G., Frigola, J., Beuron, F., Morris, E.P., and Diffley, J.F.X. (2014). Origin Licensing Requires ATP Binding and Hydrolysis by the MCM Replicative Helicase. *Mol. Cell* 55, 666–677.
- Davey, M.J., Indiani, C., and O'Donnell, M. (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture. *J. Biol. Chem.* 278, 4491–4499.
- Dhar, M.K., Sehgal, S., and Kaul, S. (2012). Structure, replication efficiency and fragility of yeast ARS elements. *Res. Microbiol.* 163, 243–253.
- Diffley, J.F.X. (2004). Regulation of Early Events in Chromosome Replication. *Curr. Biol.* 14, R778–R786.
- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., Prokhorova, T.A., and Walter, J.C. (2002). MCM2–7 Complexes Bind Chromatin in a Distributed Pattern Surrounding the Origin Recognition Complex in *Xenopus* Egg Extracts. *J. Biol. Chem.* 277, 33049–33057.
- Erzberger, J.P., and Berger, J.M. (2006). Evolutionary Relationships and Structural Mechanisms of Aaa+ Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 93–114.
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., Stillman, B., and Speck, C. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20240–20245.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM–Chk2–Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842–847.
- Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 109–131.
- Francis, L.I., Randell, J.C.W., Takara, T.J., Uchima, L., and Bell, S.P. (2009). Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2–7 helicase for Cdc7–Dbf4 phosphorylation. *Genes Dev.* 23, 643–654.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* 8, 358–366.
- Gambus, A., Khoudoli, G.A., Jones, R.C., and Blow, J.J. (2011). MCM2-7 Form Double Hexamers at Licensed Origins in *Xenopus* Egg Extract. *J. Biol. Chem.* 286, 11855–11864.

- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010). ATM Activation by Oxidative Stress. *Science* 330, 517–521.
- Holt, L.J., Tuch, B.B., Villén, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., and Morgan, D.O. (2009). Global Analysis of Cdk1 Substrate Phosphorylation Sites Provides Insights into Evolution. *Science* 325, 1682–1686.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J., and Botchan, M.R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol. Cell* 37, 247–258.
- Ilves, I., Tamberg, N., and Botchan, M.R. (2012). Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13163–13170.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Kwon, H.-J., Yamada, K., and Nakanishi, M. (2003). Identification of MCM4 as a Target of the DNA Replication Block Checkpoint System. *J. Biol. Chem.* 278, 24644–24650.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* 146, 11–31.
- Jenkinson, E.R., and Chong, J.P.J. (2006). Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7613–7618.
- Joaquin, A., and Fernandez-Capetillo, O. (2012). Signalling DNA Damage. In *Protein Phosphorylation in Human Health*, C. Huang, ed. (InTech),.
- Kamimura, Y., Tak, Y.-S., Sugino, A., and Araki, H. (2001). Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 20, 2097–2107.
- Kang, Y.-H., Galal, W.C., Farina, A., Tappin, I., and Hurwitz, J. (2012). Properties of the human Cdc45/Mcm2-7/GINS helicase complex and its action with DNA polymerase ϵ in rolling circle DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6042–6047.
- Kasiviswanathan, R., Shin, J.-H., Melamud, E., and Kelman, Z. (2004). Biochemical Characterization of the *Methanothermobacter thermoautotrophicus* Minichromosome Maintenance (MCM) Helicase N-terminal Domains. *J. Biol. Chem.* 279, 28358–28366.
- Kaykov, A., and Nurse, P. (2015). The spatial and temporal organization of origin firing during the S-phase of fission yeast. *Genome Res.* 25, 391–401.
- Klemm, R.D., Austin, R.J., and Bell, S.P. (1997). Coordinate Binding of ATP and Origin DNA Regulates the ATPase Activity of the Origin Recognition Complex. *Cell* 88, 493–502.
- Knott, S.R.V., Peace, J.M., Ostrow, A.Z., Gan, Y., Rex, A.E., Viggiani, C.J., Tavaré, S., and Aparicio, O.M. (2012). Forkhead Transcription Factors Establish Origin Timing and Long-Range Clustering in *S. cerevisiae*. *Cell* 148, 99–111.
- Krastanova, I., Sannino, V., Amenitsch, H., Gileadi, O., Pisani, F.M., and Onesti, S. (2012). Structural and Functional Insights into the DNA Replication Factor Cdc45 Reveal an Evolutionary Relationship to the DHH Family of Phosphoesterases. *J. Biol. Chem.* 287, 4121–4128.

- Lam, S.K.W., Ma, X., Sing, T.L., Shilton, B.H., Brandl, C.J., and Davey, M.J. (2013). The PS1 Hairpin of Mcm3 Is Essential for Viability and for DNA Unwinding In Vitro. *PLoS ONE* 8, e82177.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2005). ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* 308, 551–554.
- Lee, J.-K., and Hurwitz, J. (2001). Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 54–59.
- Li, M., and Zhang, P. (2009). The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div.* 4, 2.
- Lisby, M., and Rothstein, R. (2004). DNA damage checkpoint and repair centers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 328–334.
- Lygerou, Z., and Nurse, P. (2000). Cell cycle. License withheld--geminin blocks DNA replication. *Science* 290, 2271–2273.
- MacNeill, S. (2012). Composition and Dynamics of the Eukaryotic Replisome: A Brief Overview. In *The Eukaryotic Replisome: A Guide to Protein Structure and Function*, S. MacNeill, ed. (Springer Netherlands), pp. 1–17.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Mekhedov, S.L., Mirkin, B.G., and Koonin, E.V. (2005). Ancestral paralogs and pseudoparalogs and their role in the emergence of the eukaryotic cell. *Nucleic Acids Res.* 33, 4626–4638.
- Mantiero, D., Mackenzie, A., Donaldson, A., and Zegerman, P. (2011). Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J.* 30, 4805–4814.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M. (2010). Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annu. Rev. Biochem.* 79, 89–130.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166.
- Mazouzi, A., Velimezi, G., and Loizou, J.I. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Exp. Cell Res.* 329, 85–93.
- McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis. *Cell* 93, 1043–1053.
- McGeoch, A.T., Trakselis, M.A., Laskey, R.A., and Bell, S.D. (2005). Organization of the archaeal MCM complex on DNA and implications for the helicase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 756–762.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.-S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ϵ , and GINS in budding yeast. *Genes Dev.* 24, 602–612.

- Ogura, T., Whiteheart, S.W., and Wilkinson, A.J. (2004). Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* *146*, 106–112.
- Pacek, M., and Walter, J.C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J.* *23*, 3667–3676.
- De Piccoli, G., Katou, Y., Itoh, T., Nakato, R., Shirahige, K., and Labib, K. (2012). Replisome Stability at Defective DNA Replication Forks Is Independent of S Phase Checkpoint Kinases. *Mol. Cell* *45*, 696–704.
- Poplawski, A., Grabowski, B., Long, S.E., and Kelman, Z. (2001). The Zinc Finger Domain of the Archaeal Minichromosome Maintenance Protein Is Required for Helicase Activity. *J. Biol. Chem.* *276*, 49371–49377.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P., and Diffley, J.F.X. (2009). Concerted Loading of Mcm2–7 Double Hexamers around DNA during DNA Replication Origin Licensing. *Cell* *139*, 719–730.
- Rhind, N., and Gilbert, D.M. (2013). DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a010132.
- Sachs, R.K., Chen, P.-L., Hahnfeldt, P.J., and Hlatky, L.R. (1992). DNA damage caused by ionizing radiation. *Math. Biosci.* *112*, 271–303.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 39–85.
- Sanchez-Pulido, L., and Ponting, C.P. (2011). Cdc45: the missing RecJ ortholog in eukaryotes? *Bioinformatics* *27*, 1885–1888.
- Sheu, Y.-J., and Stillman, B. (2006). Cdc7-Dbf4 Phosphorylates MCM Proteins via a Docking Site-Mediated Mechanism to Promote S Phase Progression. *Mol. Cell* *24*, 101–113.
- Shi, Y., Dodson, G.E., Mukhopadhyay, P.S., Shanware, N.P., Trinh, A.T., and Tibbetts, R.S. (2007). Identification of Carboxyl-terminal MCM3 Phosphorylation Sites Using Polyreactive Phosphospecific Antibodies. *J. Biol. Chem.* *282*, 9236–9243.
- Tak, Y.-S., Tanaka, Y., Endo, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2006). A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2–Dpb11. *EMBO J.* *25*, 1987–1996.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* *445*, 328–332.
- Trenz, K., Errico, A., and Costanzo, V. (2008). Plx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions. *EMBO J.* *27*, 876–885.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C., and Dutta, A. (2000). Inhibition of Eukaryotic DNA Replication by Geminin Binding to Cdt1. *Science* *290*, 2309–2312.

- Wold, M.S. (1997). REPLICATION PROTEIN A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 61–92.
- Yeeles, J.T.P., Deegan, T.D., Janska, A., Early, A., and Diffley, J.F.X. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* 519, 431–435.
- Yekezare, M., Gómez-González, B., and Diffley, J.F.X. (2013). Controlling DNA replication origins in response to DNA damage – inhibit globally, activate locally. *J. Cell Sci.* 126, 1297–1306.
- Yoo, H.Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2004). Mcm2 is a direct substrate of ATM and ATR during DNA damage and DNA replication checkpoint responses. *J. Biol. Chem.* 279, 53353–53364.
- You, Z., Ishimi, Y., Masai, H., and Hanaoka, F. (2002). Roles of Mcm7 and Mcm4 Subunits in the DNA Helicase Activity of the Mouse Mcm4/6/7 Complex. *J. Biol. Chem.* 277, 42471–42479.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998). Control of Cyclin Ubiquitination by CDK-Regulated Binding of Hct1 to the Anaphase Promoting Complex. *Science* 282, 1721–1724.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 281–285.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (2010). Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* 467, 474–478.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16, 2–9.

Lisa 1. Erinevate hulkraksete Mcm4 N-terminaalsete ja Psf2 C-terminaalsete piirkondade joondamine

MCM4

D.melanogaster 1 MSSPARSPSVGGATPKQAGTTPTRGIA^{*}SDVET-PMRMGPGRAVRPSNISI^{*}LPPTSPGNI^{*}

zebrafish 1 MSSPSSQSRKR-----DPPTPASEDPLSPFSQRSRAHDT--STELQPMPTSPAQD

X.laevis 1 MSSPSTSPSRRRV--NVGEAVTLQL--VERKCSLLRHRKDGGQKIPHQLVSFCPCOPHLQ

chicken 1 MSSPATSPSRRRG--KRGRGSPNPTT--QDARSPFSQRRRPDDSSATGELQPTSPFPAE

human 1 MSSPATSPSRRGS--TGRGATPAQTPRSEDARSESQRRRGGDSSTSGELQPMPTSPVD

mouse 1 MSSPATSPSRRSS--RRGRVTPTQSLRSESRSPNRRRRRGEDS-STGELLPMPTSPGAD

D.melanogaster 60 -----S^{*}IPATSPARGLGANMSEID^{*}LSPLNYGTPSS^{**}MG^{*}SIR^{*}TPRSGIRGTPLRARP

zebrafish 49 -----ASIFSSPMAPR-SVLOSEIDASSPLNYGTPSSRVE-GTPRSGIRGTPARORAD

X.laevis 57 --ETFRVPCFLALAESRH-SAHOSEIDLSPLTYGTPSSRVE-GTPRSGIRGTPARORAD

chicken 57 -QSPRAPDALFSSPEQFRHSAIPLDFD^{*}ISSPLTYGTPSSRVE-GTPRSGVRGTPIRORPD

human 57 LQSPAQDVLFSSPEOMHSAIPLDFDVSSPLTYGTPSSRVE-GTPRSGVRGTPVRORPD

mouse 58 LQSPAQNALFSSPEOMHSLAIPDFDVSSPLTYGTPSSRVE-GTPRSGVRGTPVRORPD

D.melanogaster 112 IRTDKRIROVAIGGGSGLEPTPEKCSSETTDPV-SESSOAPQLVV

zebrafish 100 LGSVRKAPQVD-----MHSEPASGDAAVAGDQGAQORLVI

X.laevis 113 LGSARKVKQVD-----LHSDQPAABELVTSEOSLQOKLVI

chicken 115 LGSARKARQVD-----LHSDGP-ABDLVTAEOSLQOKLVI

human 118 LGSARKGLQVD-----LQSDGAAEDIVASEOSLQOKLVI

mouse 117 LGSARKGLQVD-----LQSDGAAEDIVSEOSLQOKLVI

Psf2

D.melanogaster 171 QRTATASQRDTSMISASAMAGSSSGPNSNSLFSQ
chicken 135 -----LRTNLQPSGSESQDF-----
zebrafish 170 -----LRSNLQP-----GRSKDY-----
X.laervis 170 -----LRTSLQNPEEQSQDY-----
mouse 170 -----LRTNLQPSSESQDF-----
human 170 -----LRTNLQPLETSQDF-----

TÄNUAVALDUSED

Täna siiralt oma juhendajaid Ivar Ilvest ja Nele Tambergi, kelle nõu ja abita ei oleks käesolev töö võimalikuks saanud. Samuti soovin tänada kõiki meie uurimisgrupi liikmeid suurepärase õhkkonna ja toetavate sõnade eest.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Märt Rannap

(sünnikuupäev: 03.10.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Inimese ja koduhiire replikatiivse CMG helikaasi subühikud Mcm4 ja Gins2 kui võimalikud rakutsükli kontrollkinaas Chk1 substraadid”,

mille juhendajad on Nele Tamberg ja Ivar Ilves,

- 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **22.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 22.05.2015